

UNTERSUCHUNGEN ZUR MIKROHETEROGENITÄT DES
MENSCHLICHEN THYROXIN-BINDENDEN
GLOBULINS (TBG).

Richard Henze

1985

Less
München

AUS DER MEDIZINISCHEN KLINIK INNENSTADT
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROFESSOR Dr. E. BUCHBORN

UNTERSUCHUNGEN ZUR MIKROHETEROGENITÄT DES MENSCHLICHEN
THYROXIN-BINDENDEN GLOBULINS (TBG).

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE IN DER GESAMTEN MEDIZIN
AN DER LUDWIG MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT ZU MÜNCHEN

vorgelegt von
Richard Henze
aus Oberstdorf

1985

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Horn
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. E. Buchborn
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.02.1986

Mein Dank gilt

Herrn Professor Dr. P.C. Scriba und Frau Professor
Dr. C.R. Pickardt für die Aufnahme in die endokrino-
logische Arbeitsgruppe und Herrn Professor Dr. K. Horn
für die Überlassung des Themas,

Herrn Dr. R. Gärtner, dessen allzeitige rat- und tat-
kräftige Hilfe entscheidend zum Zustandekommen der
Arbeit beigetragen hat,

Frau F. Haag für die Hilfe bei der Erstellung der
Ablichtungen sowie Frau Th. Kubiczek und den übrigen
Angestellten für die angenehme Zusammenarbeit,

meiner Frau für ihre tatkräftige Unterstützung bei
der Formgebung der Arbeit.

Meinen Eltern

Inhaltsangabe

<u>1.</u>	<u>Einleitung</u>	4
<u>2.</u>	<u>Methodik</u>	4
2.1.	Material	4
2.1.1.	Substanzen	4
2.1.2.	Geräte	8
2.2.	Methoden	8
2.2.1.	TBG-RIA	8
2.2.2.	TBG-Präparation aus Humanserum	8
2.2.2.1.	Allgemeines zur Affinitätschromatographie	9
2.2.2.1.1.	T ₃ -Epoxy-Sepharose	9
2.2.2.1.1.1.	Prinzip	9
2.2.2.1.1.2.	Herstellung der T ₃ -Epoxy-Sepharose	11
2.2.2.1.1.3.	Präparation der Säule	12
2.2.2.1.2.	Concanavalin A-Sepharose	12
2.2.2.1.2.1.	Prinzip	12
2.2.2.1.2.2.	Präparation der Säule	13
2.2.2.1.3.	Regenerierung und Lagerung der Gele	13
2.2.2.2.	Allgemeine Bemerkungen zur Molekularsiebchromatographie	13
2.2.2.2.1.	Sephadex G-25 Coarse	14
2.2.2.2.2.	Präparation der Säule	14
2.2.2.2.3.	Vakuumdialyse	14
2.2.2.2.3.1.	Prinzip	14
2.2.2.2.3.2.	Durchführung	15
2.2.2.2.4.	Gefriertrocknung	15
2.2.3.	Methoden zum Reinheitsnachweis von isoliertem TBG	15
2.2.3.1.	Disc-Elektrophorese	15

2.2.3.1.1.	Prinzip	16
2.2.3.1.2.	Durchführung	17
2.2.3.2.	SDS-Elektrophorese	20
2.2.3.2.1.	Prinzip	20
2.2.3.2.2.	Durchführung	20
2.2.3.3.	Ultrazentrifugation	20
2.2.3.3.1.	Sedimentationsgeschwindigkeitslauf	20
2.2.3.3.2.	Gleichgewichtslauf	21
2.2.4.	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	21
2.2.4.1.	Analytische IEF	22
2.2.4.1.1.	Prinzip	22
2.2.4.1.2.	Durchführung im Röhrchen	22
2.2.4.1.3.	Durchführung im Flachbett	24
2.2.4.1.4.	Sichtbarmachung	26
2.2.4.1.4.1.	Färbung im Gel	26
2.2.4.1.4.2.	Immunfixation	27
2.2.4.1.4.2.1.	Prinzip	27
2.2.4.1.4.2.2.	Durchführung	28
2.2.4.2.	Präparative isoelektrische Fokussierung	28
2.2.4.2.1.	Prinzip	28
2.2.4.2.2.	Durchführung	29
2.2.5.	Desialisierung	30
2.2.5.1	Hydrolytische Spaltung des TBG	30
2.2.5.1.1.	Prinzip	30
2.2.5.1.2.	Durchführung	30
2.2.5.2.	Enzymatische Abtrennung von N-Acetylneuraminsäure (NANA)	30
2.2.5.2.1.	Prinzip	30
2.2.5.2.2.	Durchführung	31
2.2.6.	Nachweis von N-Acetylneuraminsäure	32
2.2.6.1.	Prinzip	32
2.2.6.2.	Durchführung	33

2.2.7.	Bestimmung der Assoziationskonstante mit Hilfe des Scatchard-Plots	34
2.2.7.1.	Definition der Assoziationskonstante K_A	34
2.2.7.2.	Herleitung des Scatchard Algorithmus	35
2.2.7.3.	Prinzip des Scatchard Plots	37
2.2.7.4.	Zum Vorgang der Bound-free-Trennung	39
2.2.7.5.	Äquilibriumsdialyse	40
2.2.7.5.1.	Prinzip	40
2.2.7.5.2.	Beschreibung der Versuchsanordnung	41
2.2.7.5.3.	Durchführung	43
2.2.7.5.3.1.	Reinigung des T_4 -Tracers	43
2.2.7.5.3.2.	Vorbereitung der Membranen	43
2.2.7.5.3.3.	Versuchsdurchführung	44
2.2.7.5.3.4.	Qualitätskontrollen	44
2.2.7.5.4.	Berechnung der Assoziationskonstanten	45
<u>3.</u>	<u>Ergebnisse</u>	48
3.1.	TBG-Präparation	48
3.1.1.	Affinitätschromatographie auf T_3 -Epoxy-Sepharose 6 B	48
3.1.1.1.	TBG-Extraktion	48
3.1.1.2.	Waschschritte	48
3.1.2.	Con-A-Sepharose 4 B	51
3.1.3.	Dialyse + Sephadex G-25 Coarse	52
3.2.	Reinheitsuntersuchungen des TBG	52
3.2.1.	Disc-Elektrophorese	52
3.2.2.	SDS-Elektrophorese	52
3.2.3.	Scatchard-Plot	54
3.2.4.	Ultrazentrifugation	54
3.2.4.1.	Sedimentationsgeschwindigkeitslauf	54
3.2.4.2.	Gleichgewichtslauf	56
3.3.	Charakterisierung des TBG	58
3.3.1.	IEF von präpariertem TBG	58
3.3.1.1.	Verifizierung der Mikroheterogenität	58

3.3.1.2.	Veränderung der Mikroheterogenität durch Desialisierung	62
3.3.2.	Charakterisierung der einzelnen TBG-Fractionen	64
3.3.2.1.	pI und relative Verteilung der TBG-Fractionen	64
3.3.2.2.	NANA-Gehalt und Assoziationskonstante zu T_4 der TBG-Fractionen	66
3.4.	Untersuchungen nativer Einzelseren	67
3.4.1.	Normales Mikroheterogenitätsbandenmuster	67
3.4.2.	Besondere Mikroheterogenitätsbandenmuster	69
3.4.2.1.	Mikroheterogenitätsmuster von Personen mit erhöhten Östrogenserumspiegeln	69
3.4.2.2.	Mikroheterogenitätsmuster von chronisch Leberkranken	71
3.4.2.3.	Mikroheterogenitätsmuster von unreifen Frühgeborenen	72
3.4.3.	Zusammenfassende Darstellung der Mikroheterogenitätsmuster	73
<u>4.</u>	<u>Diskussion</u>	74
4.1.	Präparation	74
4.2.	Mikroheterogenität	75
4.3.	Desialisierung	77
4.3.1.	Desialisierung und Mikroheterogenitätsveränderungen	77
4.3.2.	Desialisierung und NANA-Gehalt	79
4.3.3.	Desialisierung und T_4 -TBG-Affinität	79
4.4.	Untersuchungen nativer Einzelseren	80
4.5.	Bedeutung der endständigen NANA für den Glykoproteinstoffwechsel	81
<u>5.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	85
<u>6.</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	87
<u>7.</u>	<u>Verzeichnis der Abkürzungen</u>	99

1. Einleitung

Gordon et al entdeckten 1952 (38), daß eine Komponente der α -Globuline einen großen Teil der Schilddrüsenhormone im Plasma bindet. Es wurde Thyroxin-bindendes Globulin (TBG) genannt und in die Reihe der Transportproteine aufgenommen, die zum einen als Lösungsvermittler für hydrophobe Substanzen oder Ionen im Plasma fungieren und zum anderen einen peripheren, rasch mobilisierbaren Pufferpool von Substanzen bilden.

1968 beschrieb Oppenheimer, daß mehr als 99 % des zirkulierenden Schilddrüsenhormons an Serumproteine gebunden sind, nämlich an Thyroxin-bindendes Globulin (TBG), Thyroxin-bindendes Präalbumin (TBPA) (97) und Albumin, wobei im wesentlichen die TBG-Konzentration entsprechend dem Massenwirkungsgesetz über die Konzentration von freiem Schilddrüsenhormon entscheidet (73).

Erste vorläufige Ergebnisse über Charakterisierung, Interaktion mit Hormonen und Plasmakonzentrationen von TBG wurden während der 13.Laurentinischen Hormonkonferenz von Robbins und Rall 1957 (84) bekanntgegeben. Die Präparation von TBG bereitete erhebliche Probleme (34,59,93,98), wofür niedrige Plasmakonzentrationen und relative Instabilität verantwortlich gemacht wurden. Bedeutende Präparationsfortschritte gelangen erstmals Pensky und Marshall (76), indem sie 1969 die Technik der Affinitätschromatographie anwandten. Verschiedene Gruppen (Korcek et al 1974 (55), Nielsson et al 1975 (71), Cavalieri et al 1975 (11), Gershengorn et al 1977 (31), Zinn et al 1978 (117), Horn et al 1977 (45), Kagedal et al 1977 (47)), bemühten sich, schonendere und effektivere Präparationsverfahren zu etablieren, wozu aber immer noch viele Reinigungsschritte erforderlich waren.

Da TBG leicht denaturiert wird (32) und schnell seine Bindungsfähigkeit verliert (56), war der erste Teil der vorliegenden Arbeit der Weiterentwicklung der affinitätschromatographischen Präparationsmethode von TBG aus Serum gewidmet. Es sollten rasch und schonend größere Mengen möglichst nicht denaturierten TBG's für die nachfolgenden Charakterisierungsversuche gewonnen werden.

Schon seit 1960 (Robbins et al (85)) ist bekannt, daß TBG zur Gruppe der Glykoproteine zählt. Nachdem Nielsson et al 1975 (71) postuliert hatten, daß TBG ein stabiles Gebilde aus vier identischen Untereinheiten sei, konnten Gershengorn et al 1977 (31) zeigen, daß TBG aus einer fortlaufenden Polypeptidkette besteht und als kompaktes Molekül ohne angelagerte Peptiduntereinheiten (86), jedoch mit vier zuckerhaltigen Seitenketten (117) vorliegt. Das Molekulargewicht beträgt ca. 60.000 daltons, wobei der Zuckeranteil ca. 15 % beträgt (57,60).

Mit dem Bindungsverhalten zwischen den Schilddrüsenhormonen und TBG haben sich schon zahlreiche Gruppen beschäftigt (12,26,41,45, 56,70,71,74,80,82,85,100,101,114). Nachdem Präparationsverfahren für TBG verbessert worden waren und damit reines TBG zur Verfügung stand, kam man zu folgenden Ergebnissen: TBG kann nur ein T_3 - oder T_4 -Molekül binden. Es übertrifft Albumin um den Faktor 10^4 , Präalbumin um den Faktor 10^2 hinsichtlich der Affinität zu T_4 . Die T_3 -TBG-Affinität ($K_A=10^8-10^9 \text{ M}^{-1}$) beträgt nur 1/10 der T_4 -TBG-Affinität ($K_A=10^9-10^{10} \text{ M}^{-1}$).

1973 konnten Marshall et al (62) erstmals zeigen, daß TBG nach isoelektrischer Fokussierung (IEF) eine Mikroheterogenität aufweist. Dies konnte in unserem Labor nachvollzogen werden (28,44,45). Bis vor kurzem wurden als mögliche Ursachen der Mikroheterogenität genetisch determinierte Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung des TBG (62) oder irreversible Veränderungen des Moleküls nahe seinem isoelektrischen Punkt (33) diskutiert.

In Anlehnung an die Tatsache, daß nahezu alle Glykoproteine Mikroheterogenitäten aufweisen, die in unterschiedlichen Zusammensetzungen der Kohlenhydratketten begründet sind, ist dies auch für TBG zu vermuten. Eine dominierende Rolle in diesem Zusammenhang spielt die N-Acetylneuraminsäure (NANA), die nahezu immer endständig und auf unterschiedliche Weise mit dem präterminalen Zucker verknüpft ist.

Nach der Weiterentwicklung der TBG-Präparationsmethode war der zweite Abschnitt dieser Arbeit den Fragen gewidmet, ob es eine TBG-Mikroheterogenität (und damit TBG-Fraktionen) gibt, ob eventuell die N-Acetylneuraminsäure in irgendeinem Zusammenhang

damit steht, ob die Affinitäten von T_4 zu den TBG-Fraktionen unterschiedlich sind und ob eventuell der T_4 -TBG-Quotient für den klinischen Gebrauch revidiert werden muß. Darüberhinaus stand die Frage im Raum, ob sich Hinweise auf die Existenz von TBG-Varianten mit unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung der TBG-Hauptkette finden. Dazu wurde ein Immunfixationselektrophoreseverfahren angewandt.



2. Methodik

2.1. Material

2.1.1. Substanzen

Zu TBG-Präparation incl. TBG-RIA

Serum, gepoolt in Routinelabors (schwängere und nichtschwängere Patientinnen);
isoliertes reines TBG, kalibriert an alter Eichkurve (TBG-Standard für TBG-RIA);
isoliertes reines TBG, radioaktiv markiert mit Na-¹²⁵I (TBG-Tracer für TBG-RIA);
TBG-Antiserum, gewonnen in Kaninchen monospezifisch nach Grabar-Williams (39) bzw. Clarke-Freeman (15);
Trijodthyronin (T₃) (Fa. Henning)
T₃, radioaktiv markiert mit Na-¹²⁵I;
Tetraiodthyronin (T₄) (Fa. Henning)
Humalbumin (Fa. Behring)
Rinderalbumin (Fa. Roth)
α-Methyl-D-Mannosid (Fa. Roth)
Rinder-Globulin (Fa. Serva)
Äthanolamin "
Epoxy-12 carbon spacer-Sepharose 6 B (Fa. Pharmacia)
Concanavalin A-Sepharose 4 B "
Sephadex G-25 Coarse "
Polyäthylenglykol (Fa. Merck)
Dimethylsulfoxid "
Natriumchlorid "
Aquadest "
NaOH "
HCl "
Natriumacetatpuffer pH 4,0 bzw. 5,6 "
Tris-HCl-Puffer pH 7,4 bzw. 8,6 bzw. 9,0 "
Boratpuffer pH 8,9 "

Zu Disc- und SDS-Elektrophorese

Acrylamid	(Fa. Serva)
N,N'-Methylenbisacrylamid	"
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	"
Ammoniumpersulfat	"
Coomassie Brilliant Blue R 250	"
Natriumdodecylsulfat	(Fa. Sigma Chemicals)
HCl	(Fa. Merck)
Phosphorsäure	"
Aquadest	"
Bromphenolblau	"
5,5-Diäthylbarbitursäure	"
Essigsäure	"
Methanol	"
Mercaptoäthanol	"
Glycin	"
Tris	"
Tris-Phosphatpuffer pH 5,5 bzw. 6,7	"

Zu analyt. und präp. IEF; Immunfixation

Acrylamid	(Fa. Serva)
N,N'-Methylenbisacrylamid	"
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)	"
Ammoniumpersulfat	"
Coomassie Brilliant Blue R 250	"
Sulfosalicylsäure	"
Ampholine-Lösungen pH 3,5-5 und pH 3,5-10	(Fa. LKB)
Ultrodex ^R (gereinigtes Sephadex G-75)	"
Aquadest	(Fa. Merck)
Phosphorsäure	"
NaOH	"
Saccharose	"
Bromphenolblau	"
Essigsäure	"

Äthanol	(Fa. Merck)
Riboflavin	"
Glycerin	"
Trichloressigsäure	"
Veronelpuffer pH 8,8	"
Natriumphosphatpuffer	"
Ampholine-Lösungen pH 3,5-5 und pH 3,5-10	(Fa. LKB)
Filterpapierstreifen	(Fa. Whatman)
Cellulose-Acetatstreifen	(Fa. Millipore)

Zur Desialisierung

Schwefelsäure	(Fa. Merck)
Aminosäurenlösung	"
Natriumacetatpuffer pH 4,0 bzw. 5,6	"
Glycin-NaOH-Puffer pH 11	"
Neuraminidase-Präparationen EC 3.2.1.18	
- Clostridium perfringens	(Fa. Boehringer)
- Vibrio Cholerae + Influenza Virus	(Fa. Calbiochem)
- Vibrio Cholerae	(Fa. Behring)
Aprotinin	(Fa. Behring)

Zum NANA-Nachweis

Schwefelsäure	(Fa. Merck)
Cyclohexanon	"
Natriummetaperjodat	"
Phosphorsäure	"
Natriumarsendioxid	"
Natriumsulfat	"
2-Thiobarbitursäure	(Fa. Serva)

Zur Äquilibriumedialyse

Tetraiodthyronin (T_4)	(Fa. Henning)
T_4 , radioaktiv markiert mit Na- ^{125}J	
Sephadex LH 20	(Fa. Pharmacia)
Äthanol	(Fa. Merck)
HCl	"
Propylenglykol	"
Aquadest	"
Tris-HCl-Puffer pH 7,4 bzw. 8,6 bzw. 9,0	"
Rinder- γ - Globulin	(Fa. Serva)
Visking-Dialysierschläuche 20/32	"

2.1.2. Geräte

pH-Meter: pH Digi 510, (Fa. WTW)
 γ -Counter (Fa. Nuclear Enterprise)
Tischzentrifuge: 3200 (Fa. Eppendorf)
Zentrifuge: Rotixa IK (Fa. Hettich)
Photometer: 1100 M (Fa. Eppendorf)
Proportionierpumpe (Fa. Ismatec)
Lyophilisator: Beta (Fa. Christ)
Dialysiergerät: Dianorm (Fa. Bachofer)
Chromatographieausrüstung (Fa. LKB)
Disc-Elektrophoreseausrüstung (Fa. LKB)
IEF-Ausrüstung, analytisch und präparativ (Fa. LKB)
Balkenwaagen (Fa. Mettler)
Temperaturkonstanthalter: FI (Fa. Haake)
Tischrechner (Fa. Olivetti)
Rechenanlage: 404/3 (Fa. Siemens)

2.2. Methoden

2.2.1. TBG-RIA

Der TBG-Radioimmunoassay zur Identifizierung und Quantifizierung auch kleinster TBG-Mengen wurde entsprechend der Beschreibung von Horn et al.(45) durchgeführt.

Die Berechnung der Eichkurve und der TBG-Konzentrationen in den einzelnen Proben erfolgte auf der Grundlage der Spline-Approximation durch eine elektronische Rechenanlage (Siemens 404/3) (25,58).

2.2.2. TBG-Präparation aus Humanserum

Ausgehend von einem von Horn (45) und anderen (11,31,45,47, 55,117) angegebenen Verfahren zur Isolierung von TBG wurde eine effiziente Methode entwickelt, so daß die gesamte Präparation nur aus zwei spezifischen affinitätschromatographischen Schritten bestand.

2.2.2.1. Allgemeines zur Affinitätschromatographie

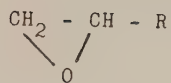
Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht darauf, daß durch eine hohe Affinität der zu isolierenden Substanz zu einer Komponente eines Gels diese Substanz so gut gebunden wird, daß durch verschiedene Spülschritte die unerwünschten Substanzen möglichst vollständig vom Gel entfernt werden können, nicht jedoch die zu isolierende Substanz (18). Durch einen geeigneten Elutionsschritt wird dann die gesuchte Substanz relativ hoch gereinigt wiedergewonnen.

2.2.2.1.1. I₃-Epoxy-Sepharose

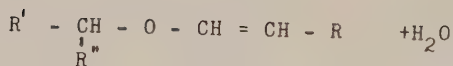
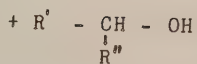
2.2.2.1.1.1. Prinzip

Sepharose ist ein Gel aus hochgereinigter Agarose, welche nach Entfernen der geladenen Polysaccharide möglichst nur noch neutrale Polysaccharide enthält (77). Die einzelnen Polysaccharidketten formen nach Erhitzen beim Abkühlen spontan Doppelhelices, die sich zu Bandstrukturen zusammenlagern und ein großporiges stabiles Gel bilden. Umso kleiner der Agarosegehalt, umso besser ist der Trenneffekt bei kleinen Molekülen. Obwohl die Gelstruktur nur durch Wasserstoffbrückenbindungen gehalten wird, ist die Stabilität groß, so daß im Verlauf der Chromatographie mit Lösungen höherer Ionenstärke gespült werden kann.

Die hier verwendete Epoxy-Sepharose 6 B ist eine Sepharose mit einem Agaroseanteil von 6%, an die 1,4-bis-(2,3 epoxy-propoxy) butan-Gruppen als sogenannte Spacer angekoppelt sind. Durch die kurze Baulänge von 12 Kohlenstoffatomen wird der geringe Molekularsiebeeffect der Sepharose 6 B (10^4 - 4×10^6 daltons) nur unwesentlich beeinflußt. Die hochreaktiven Oxirangruppierungen am Ende der Spacer stehen zur Bildung von Ätherbindungen mit Amino-, Hydroxyl- und Thiolgruppen von Substanzen entsprechender Größe zur Verfügung.



Epoxy-12 carbon
spacer-Sepharose



Es existieren mehrere Liganden zu TBG (verschiedene Derivate des Thyronins), von denen zwei besonders hohe Assoziationskonstanten zum TBG aufweisen ($T_4:K_A \sim 0,1-2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $T_3:K_A \sim 0,1-1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$) (115), wobei beide kommerziell in ausreichend gereinigtem Zustand erhältlich sind.

Um zur späteren spezifischen TBG-Desorption vom Chromatographiegel eine Substanz mit noch höherer TBG-Affinität in Reserve zu haben, wurde das 3',3,5-Trijodthyronin (T_3) als Ligand verwendet. Bei der Herstellung einer T_3 -Sepharose ist zu beachten, daß T_3 drei reaktionsfähige Gruppen (Hydroxyl-, Amino- und Carboxylgruppe) besitzt. Damit die OH-Gruppe ($pK \sim 10,1$) des T_3 zur TBG-Bindung frei bleibt (43), soll das T_3 seinerseits über die Aminogruppe ($pK \sim 9,8 \pm 1$) an den Spacer gekoppelt werden. Folglich ist für die Koppelung ein möglichst niedriger pH-Wert anzustreben.

Als Affinitätsgel wurde eine Epoxy-Sepharose 6 B verwendet. Da die Epoxy-Gruppe zwischen pH 9 und 13 bindungsfähig ist, und T_3 auch nur im alkalischen Milieu ($pH \sim 9,5 - 10$) in Lösung gehalten werden kann, erfolgt die Koppelung des T_3 an die Epoxy-Sepharose bei pH 9,6.

2.2.2.1.1.2. Herstellung der T_3 -Epoxy-Sepharose

15 g Epoxy-Sepharose wurden ca. eine Stunde in Aqua dest. gequollen (1g ergibt $\sim 3\text{ml}$ Gel), anschließend wurden die vom Hersteller zugesetzten Stabilisatoren durch exzessives Waschen mit Aqua dest. (1.000ml) über eine Glasfritte G3 entfernt. 600mg T_3 wurden in 5ml 1N NaOH aufgelöst und mit 10ml Dimethylsulfoxid und 10ml Boratpuffer pH 8.9 versetzt, so daß die endgültige Dimethylsulfoxidkonzentration weniger als 50% betrug (77). Schließlich wurde der Puffer mit 1N HCl auf pH 9,6 eingestellt. Diese T_3 -Lösung wurde zusammen mit der frisch gewaschenen feuchten Sepharose ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Anschließend wurde das nicht kovalent gebundene I_3 über eine Fritte nacheinander mit 500ml 0,05 N NaOH, 500ml 0,1M Natriumacetatpuffer pH 4,0, 100ml 40% (v/v) Dimethylsulfoxid in 0,1M Veronalpuffer pH 8,8 und 500ml 0,1M Veronalpuffer pH 8,8 entfernt. Zur Absättigung der noch freien Bindungsgruppen an der Epoxy-Sepharose wurde mit 50ml 1M Äthanolaminlösung in 0,1M Boratpuffer pH 8,9 über Nacht geschüttelt. Nach Abtrennung des überschüssigen Äthanolamins mit ca. 500ml 0,1M Veronalpuffer pH 8,8 über eine Fritte stand die fertige I_3 -Sepharose zur Verfügung.

Zur Sofortkontrolle des Kopplungsvorgangs wurden der ursprünglichen I_3 -Lösung geringe Mengen gereinigten I_3 -Tracers zugesetzt und die Aktivität der I_3 -Sepharose nach der Koppelung gemessen. Darüberhinaus konnte dadurch nach jedem IBG-Präparationszyklus die I_3 -Sepharose hinsichtlich ihres I_3 -Gehaltes kontrolliert werden.

2.2.2.1.1.3. Präparation der Säule

Die gewaschene I_3 -Sepharose wurde in eine 10cm hohe, 3cm durchmessende Säule gegeben und mit 0,1M Veronalpuffer pH 8,9 + 1M NaCl gespült.

2.2.2.1.2. Concanavalin A-Sepharose

2.2.2.1.2.1. Prinzip

Bei diesem Gel ist Concanavalin A, ein pflanzliches Metalloprotein, welches Erythrozyten zu agglutinieren und mit Polysacchariden und Glykoproteinen in Anwesenheit von zweiwertigen Metallionen (Mn^{++} , Ca^{++} , Mg^{++}) spezifisch zu reagieren vermag, mit Hilfe der Bromcyanmethode kovalent an eine AH-Sepharose 4 B gekoppelt worden. Zur spezifischen Bindung ist es erforderlich, daß der Ligand die Ringkonfigurationen (Pyranosen) der D-Mannose bzw. D-Glukose enthält, und daß sich an den C₃-, C₄- und C₆-Positionen der Pyranosen Hydroxylgruppen befinden (23,72). Diese

Zuckerkonfigurationen kommen im Oligosaccharidanteil des TBG vor (14). Die Desorption erfolgt entweder mit α -D-methyl-Mannosid oder α -D-methyl-Glukosid gelöst in Boratpuffer.

2.2.2.1.2.2. Präparation der Säule

Das bereits gequollene Gel wurde in eine 2cm durchmessende und je nach TBG-Menge (1mg TBG auf 5ml Gel) in eine 40-60cm hohe Säule gegeben und zur Entfernung der Konservierungsmittel mit 0,05M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 + 0,5M NaCl vorgespült.

2.2.2.1.3. Regenerierung und Lagerung der Gele

T₃-Sepharose wurde nach Gebrauch sofort der folgenden Prozedur unterzogen:

Gel in eine Fritte geben und alternierend mit je dem 30-fachen Säulenvolumen von 0,1N NaOH und 0,1N Natriumacetatpuffer pH 4,0 spülen.

Lagerung in 0,1M Veronalpuffer pH 8,8.

Con A-Sepharose wurde regeneriert mit je dem 10-fachen Gelvolumen von 0,1M Saccharoselösung + 0,5M NaCl, 0,1M Tris-HCl-Puffer pH 9,0 + 1M NaCl, 0,1M Natriumacetatpuffer pH 4,0 und 0,05M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 + 0,5M NaCl + 0,01M CaCl₂ + 0,02M MgCl₂.

Lagerung in 0,05M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 + 0,5M NaCl.

2.2.2.2. Allgemeine Bemerkungen zur Molekularsiebchromatographie

Bei diesem Verfahren, das auch als Gel- oder Hohlraumdiffusionschromatographie bezeichnet wird, erfolgt die Trennung von Stoffgemischen aufgrund ihrer unterschiedlichen Molekülgröße (und nicht des Molekulargewichts). Der Trennmechanismus besteht darin, daß kleinere Moleküle in die Gelpartikel eindringen können, größere Moleküle aber an der Partikeloberfläche vorbeiströmen und so die gesamte Säule schneller durchlaufen.

2.2.2.2.1. Sephadex G-25 Coarse

Sephadexgele bestehen aus Dextranmolekülen (Glukosemoleküle in α -1,6 glukosidischer Bindung), die mittels Epichlorhydrin mehr oder weniger stark miteinander vernetzt sind (77). Sie sind aufgrund ihrer großen Zahl von Hydroxylgruppen extrem hydrophil und liegen in Form von kleinsten Kügelchen vor, die nach Zugabe von Wasser aufquellen. Durch entsprechende Wahl des Gels wird das Ausschlußvolumen und damit die Auftrennung der Substanzen bestimmt (hier: Molekulargewicht ca. 1.000-5.000 daltons). Die Salze, die im Con A-Eluat noch enthalten sind, werden zuverlässig von den IBG-Molekülen abgetrennt.

2.2.2.2.2. Präparation der Säule

Das in Aqua bidest. gequollene Gel wurde in der Säule mit doppelt destilliertem Wasser vorgespült. Vor jeder erneuten Verwendung sollten eventuell unspezifisch adsorbierte Substanzen mittels einer Salzlösung mit hoher Ionenstärke ausgewaschen werden.

2.2.2.2.3. Vakuumdialyse

2.2.2.2.3.1. Prinzip

Da nach der gelchromatographischen Entsalzung das IBG stark verdünnt ist, wurde zur Konzentrierung eine Vakuumdialyse gegen Aqua bidest. angeschlossen. Dazu wurde die Sartorius-Dialysiervorrichtung verwendet, wobei ein dünner Schlauch als semipermeable Membran mit definierter Porengröße in einer unterdruckfesten Kammer eingelegt ist. Die Porengröße ist so gewählt, daß Wasser und eventuell verbliebene Salz-, nicht jedoch IBG-Moleküle durchtreten können. Der Konzentrationsvorgang ist also mit einem Entsalzungsvorgang gekoppelt.

2.2.2.2.3.2. Durchführung

Über ein Wasserschloß (Sicherheit bei undichtem Dialyserschlauch) erzeugte eine Wasserstrahlpumpe Unterdruck in der Dialysierkammer, so daß kleine Moleküle (MG = unter 10.000 daltons) aus dem Schlauchinneren ins Kammerlumen übertreten und abgesaugt werden konnten. Die Proteinklösung wurde solange durch den Schlauch gepumpt, bis eine ausreichende Konzentrierung stattgefunden hatte. Gleichzeitig erfolgte durch die Dialyse eine Entsalzung. Zum Zwecke der Resolvierung von an der Schlauchwand adsorbierten IBG-Molekülen ließ man bei isobaren Verhältnissen Aqua bidest. für kurze Zeit ins Schlauchinnere zurückdiffundieren. Zur Reinigung wurde der Schlauch unter hohem Druck mit Aqua bidest durchgespült.

2.2.2.2.4. Gefriertrocknung

Nach Einbringen der salzfreien, tiefgefrorenen Proteinklösung in den Druckbehälter erzeugt eine Rotationspumpe ein Hochvakuum, in dem das Eis der Probe sofort zu Wasserdampf sublimiert. Ein Kältekondensator (Niederschlag von Wasserdampf) hält den Wasserdampfpartialdruck auf so niedrigem Niveau, daß der Sublimationsvorgang rasch genug abläuft, um seinerseits durch die entstehende Verdunstungskälte ein Auftauen der Probe zu verhindern.

2.2.3. Methoden zum Reinheitsnachweis von isoliertem IBG

2.2.3.1. Disc-Elektrophorese

Die Disc-Elektrophorese gilt als sensitiver und dabei schnell und einfach durchführbarer Nachweis der Reinheit einer Substanz (21,27,64,116).

2.2.3.1.1. Prinzip

Die beiden Monomere Acrylamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ und N,N'-methylen-bis-acrylamid $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ reagieren in Anwesenheit von Katalysatoren (N,N,N',N'-tetramethyläthyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat) zu einem Polymerisat, das bei geeigneter Wahl der Monomerkonzentrationen ein Netzwerk definierter Porengröße darstellt. Eine Elektrophoresestrecke besteht aus zwei übereinandergeschichteten Polyacrylamidgelen, welche sich hinsichtlich Vernetzungsgrad (Porengröße) und pH-Wert unterscheiden. Der an der Kontaktfläche entstehende Spannungs- und pH-Gradient hat eine Konzentrierung der Probe im großporigen Sammelgel zur Folge, was zur nachfolgenden scharfen Auftrennung im feinporigen Trenngel beiträgt (27). Auftrennungskriterien bei der Disc-Elektrophorese sind Ladung, Größe und Form der Moleküle. Dabei ist es theoretisch möglich, daß verschiedene Proteine bei entsprechender Kombination dieser Kriterien (klein, wenig geladen: groß, stark geladen) die gleichen Wanderungseigenschaften in einem Gelsystem haben. Daher muß als eindeutiges Reinheitszeichen jeweils eine singuläre Bande in verschiedenen Gelkonzentrationen und Puffersystemen gefordert werden. Zur Charakterisierung des Gelsystems werden jeweils der pH-Wert und die Acrylamidkonzentrationen für das Trenngel angegeben.

Definition von Hjerten:

$$T = \frac{a+b}{m} \times 100 \times \frac{\text{ml}}{g} \%$$

$$C = \frac{b}{a+b} \times 100 \times \%$$

a = Acrylamid g

b = N,N'-Methylen-bis-acrylamid g

m = Wasser oder Puffer ml

2.2.3.1.2. Durchführung

Die Disc-Elektrophorese wurde entsprechend der Vorschrift von Maurer durchgeführt (64).

Stammlösungen

Trenngel

T = 7,7 % C = 2,6 %

Lsg 1 30,0g Acrylamid
0,8g Bisacrylamid

Lsg 3 36,6g Tris
0,23ml TEMED
mit 1 N HCl
pH 8,9 einstellen

Lsg 5 6,85g Tris
0,46ml TEMED
mit 1 N HCl
pH 7,5 einstellen

Lsg 7 0,14g Ammoniumpersulfat

Sammelgel

T = 3,1 % C = 3,2 %

Lsg 2 12,0g Acrylamid
0,4g Bisacrylamid

Lsg 4 5,7g Tris
0,46ml TEMED
mit o-Phosphorsäure
pH 6,7 einstellen

Lsg 6 4,95g Tris
0,46ml TEMED
mit o-Phosphorsäure
pH 5,5 einstellen

Lsg 8 0,20g Ammoniumpersulfat

Alle Lösungen (1 - 8) wurden jeweils in 100 ml Aqua Bidest angesetzt.

Ansatz

Gelsystem pH 8,9

Trenngel

2 Teile Lsg 1
1 Teil Lsg 3
4 Teile Lsg 7
1 Teil Aqua bidest.

Sammelgel

2 Teile Lsg 2
1 Teil Lsg 4
4 Teile Lsg 8
1 Teil Aqua bidest.

Elektrodenpuffer:

0,6g Tris
2,88g Glycin
ad 1.000ml Aqua bidest. (= pH 8,3)

Probenpuffer:

0,05M Tris-Phosphatpuffer pH 6,7
20g% Saccharose
1Vol% Bromphenolblau

Gelsystem pH 7,5

Trenngel

2 Teile Lsg 1
1 Teil Lsg 5
4 Teile Lsg 7
1 Teil Aqua bidest.

Sammelgel

2 Teile Lsg 2
1 Teil Lsg 6
4 Teile Lsg 8
1 Teil Aqua bidest.

Elektrodenpuffer:

5,52g Diäthylbarbitursäure
1,0g Tris
ad 1.000ml Aqua bidest. (= pH 7,0)

Probenpuffer:

0,05M Tris-Phosphatpuffer pH 5,5
20g% Saccharose
1Vol% Bromphenolblau

Färben

5 Teile	Aqua bidest.
5 Teile	Methanol
1 Teil	Eisessig
0,25g%	Coomassie Brilliant Blue R 250

Zuerst wurde Trenngellösung nach obigem Schema bereitet, entgast und ca. 11,6 cm hoch in silikonisierte Glasröhrchen (l=15cm, d=0,6cm) gegeben. Nach Polymerisation wurde mit analog bereiteter Sammelgellösung ca. 2,2cm vorsichtig überschichtet.

Die aufzutragende Probe sollte folgenden Kriterien genügen:

Volumen: 10-200 μ l

Proteinmasse: mindestens 20 μ g (mit Probenpuffer 1:1,5 bis 1:2 verdünnt)

Die Elektrophoreseeinheit bestand aus einem Wassermantel mit Anschluß zum Kühlaggregat und der eigentlichen Elektrophoresekammer, die mit kaltem Elektrodenpuffer gefüllt war. Eine zwischengeschaltete Trägerplatte nahm in ihren Bohrungen die fertig präparierten Glasröhrchen auf und diente gleichzeitig zur Trennung der elektrischen Pole.

Nach einem kurzen Vorlauf (je Röhrchen 40 V Spannung) wurde das Sammelgel über das oben offene Glasröhrchen vorsichtig mit Probe überschichtet (Eppendorfpipette), wobei die konzentriert zugesetzte Saccharose (Probenpuffer) für rasche Sedimentation auf die Sammelgeloberfläche sorgte. Unter ständiger Kühlung des Wassermantels wurden pro Röhrchen ca. 6mA konstanten Stromfluß von oben nach unten angelegt (Maximalspannung 200V). Nach ca. 5 Stunden (Bromphenolfront als Marker) wurden die Röhrchen entnommen, die Gele vorsichtig herausgelöst und für ca. 4 Stunden in 0,25g% Coomassie Brilliant Blue-Lösung eingelegt. Anschließende Entfärbung in der entsprechenden Stammlösung für 24-48 Stunden machte das Elektrophoreseergebnis sichtbar.

2.2.3.2. SDS-Elektrophorese

2.2.3.2.1. Prinzip

Die SDS-Elektrophorese stellt eine Disc-Elektrophorese unter veränderten chemischen Bedingungen dar. Dabei wird durch Vorinkubation von Probe mit SDS (sodium-dodecyl-sulfate) und Mercaptoäthanol zweierlei bewirkt:

1. Mercaptoäthanol stört aufgrund seiner alkoholischen Hydrophobie die hydrophilen Wechselwirkungen und reduziert die Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen, so daß die räumliche Anordnung der Proteine zerstört wird (Denaturierung), nicht aber ihre Primärstruktur (Polypeptidkette) (43,116).

2. Dodecylsulfat-Anionen des Detergens SDS bilden mit Proteinen einen Komplex, so daß diese hinsichtlich ihrer negativen Gesamtladung einander ähnlicher werden (64).

Die Proteine werden dementsprechend vornehmlich nach ihrer Molekülgröße und weniger nach ihrer Eigenladung aufgetrennt.

2.2.3.2.2. Durchführung

In einer dreistündigen Vorinkubation bei 37°C (116) wurden der konzentrierten Probenlösung (1mg/ml) SDS (Endkonzentration 1g%) und Mercaptoäthanol (Endkonzentration 1Vol%) zugesetzt. Vor Auftragen auf das Sammelgel wurde mit Probenpuffer 1:2 verdünnt. Bis auf den Zusatz von SDS in 0,1g% Endkonzentration (116) galt für Trenngel, Sammelgel und Elektrodenpuffer das gleiche wie zur Disc-Elektrophorese. Weiteres Procedere siehe ebenda.

2.2.3.3. Ultrazentrifugation (90,115)

2.2.3.3.1. Sedimentationsgeschwindigkeitslauf

Der Sedimentationsgeschwindigkeitslauf dient zur Überprüfung der Reinheit und Homogenität einer Proteinlösung. Während die Zentrifuge mit hoher Geschwindigkeit rotiert, wird photometrisch (280nm) beobachtet, mit welcher Geschwindigkeit das initial gleichmäßig in Puffer verteilte Protein der Zentrifugalkraft folgt, d.h. wie schnell die Proteinkonzentration im Meniskusbe-

reich ab- und im Zellenbodenbereich zunimmt, bis sich schließlich das gesamte Protein am Boden niederschlägt und der Puffer proteinfrei ist. Aus dieser Geschwindigkeit läßt sich der Sedimentationskoeffizient errechnen. Wären in der Proteinlösung Fremdstoffen mit niedrigerem oder höherem Molekulargewicht würde man aufgrund unterschiedlichen Sedimentationsverhaltens mehrere Komponenten im Sedimentationsdiagramm sehen.

2.2.3.3.2. Gleichgewichtslauf

Der Gleichgewichtslauf wird bei niedrigerer Umdrehungszahl als der Sedimentationsgeschwindigkeitslauf durchgeführt, damit das Protein, das in drei verschiedenen Konzentrationen in eine Mehrfachsektorzelle gefüllt ist, nicht so stark sedimentiert. Hat sich eine stabile Proteinverteilung im Rotationsschwerefeld eingestellt, wird photometrisch (280nm) die Konzentration gemessen. Der Zehnerlogarithmus der Konzentration (in mm/Schreiberaus-schlag) wird an der Ordinate, das Quadrat des zugehörigen Abstands vom Rotationszentrum an der Abszisse aufgetragen. Aus der so entstehenden Verteilungskurve wird das Molekulargewicht errechnet. Befinden sich die Punkte auf einer Geraden, ist dies ein weiteres Zeichen für die Reinheit der Präparation. Zur Berechnung des partiellen spezifischen Volumens muß die Aminosäuren- und Kohlenhydratzusammensetzung bekannt sein. Aus Molekulargewicht, Sedimentations- und Diffusionskoeffizienten errechnen sich der Stokes Radius, der ein Maß für die Größe des Moleküls ist, und der Quotient des Reibungskoeffizienten, der eine Aussage über die Form des Moleküls erlaubt.

2.2.4. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Eine weit sensitivere Methode, Proteine getrennt voneinander darzustellen, ist die isoelektrische Fokussierung (isoelectric focusing). Einziges Auftrennungskriterium ist der isoelektrische Punkt, nicht hingegen Molekülgröße oder Molekülform. Damit ist es möglich, Substanzen zu isolieren, deren isoelektrische Punkte (pI) sich nur um wenige Hundertstel einer pH-Einheit voneinander

unterscheiden. Im Gegensatz zu konventionellen Elektrophorese-techniken ist während der Trennung ein Konzentrierungseffekt am isoelektrischen Punkt wirksam, der eine unkomplizierte Probenapplikation gestattet und die untere Nachweisgrenze hinsichtlich der Probenmenge während der anschließenden Sichtbarmachung sehr niedrig hält.

Die IEF findet sowohl im präparativen als auch im analytischen Sektor Anwendung.

2.2.4.1. Analytische IEF

2.2.4.1.1. Prinzip

Im isoelektrischen Feld wird durch aliphatische amphotere Poly-amino- und Polycarboxylsäuren (Trägerampholyten) ein linearer pH-Gradient mit definierten Endpunkten aufgebaut. Zur Stabilisierung des Gradienten während des Fokussiervorgangs trägt der Saccharosegehalt des Polyacrylamidgels und der niedrige elektro-osmotische Fluß desselben bei. Die Banden der an ihrem isoelektrischen Punkt konzentrierten Substanzen werden entweder direkt oder indirekt mittels immunologischer Methoden nachgewiesen. Die analytische IEF kann im Röhrchen oder im Flachbett durchgeführt werden.

2.2.4.1.2. Durchführung im Röhrchen

Die Ampholineendkonzentration darf 2% (w/v) nicht unterschreiten. In präliminären Versuchen und zur genauen Bestimmung des pI von TBG wurde die Röhrchenmethode nach einer Vorschrift von MRA (Medical Research Apparaters) angewandt.

Stammlösungen

T = 5% C = 3% nach Hjerten

Ampholinekonzentration = 2% (w/v)

Lsg 1 20,0g Acrylamid
 0,8g Bisacrylamid

Lsg 2 2,0g Ammoniumpersulfat

die Lösungen 1 + 2 wurden mit 100ml Aqua dest angesetzt.

Ansatz

4ml Aqua bidest.

1,5ml Lsg 1

0,02ml TEMED

0,32ml Ampholine^R 40% (w/v)

0,09ml Lsg 2

Anodenlösung: 0,01M H_3PO_4

Kathodenlösung: 0,01M NaOH

Kunststoffröhrchen (l=17,5cm; d= 0,5cm) wurden ca. 15 cm hoch mit entgaster IEF-Lösung gefüllt und nach Polymerisation in ein Gehäuse eingesetzt, welches demjenigen zur Disc-Elektrophorese ähnlich ist. Während eines halbstündigen Vorlaufs bei konstanter Stromstärke (1mA/Röhrchen, max. 350V) bildete sich der pH-Gradient aus.

Kriterien für die Probe sind: Volumen: 10-200 μ l

Proteinmasse: 20-200 μ g

Die Proteinlösung (möglichst in Aqua oder verdünnten Puffern) wurde mit Saccharose (20g%), Bromphenolblau (1g%) als Marker und gleicher Ampholine^R (2-4Vol%) versetzt.

Unter ständiger Kühlung wurde ein konstanter Stromfluß von 1mA/Röhrchen bei 500V Maximalspannung angelegt. Nach ca. sechs Stunden (Bromphenolblaufront nimmt je nach verwendetem pH-Bereich eine andere Farbe an) wurden die Gele für ca.vier Stunden in folgender Lösung gefärbt:

50% Aqua dest.

45% Äthanol + 0,2g% Bromphenolblau

5% Eisessig

Das ca. 24-stündige Entfärben geschah in folgender Lösung.

65% Aqua dest.

30% Äthanol

5% Eisessig

(Coomassie-Brilliant-Blue kann hier nicht verwendet werden, da es außer Proteine auch die Trägerampholyten anfärben würde. Diese müßten zuvor ausgewaschen werden.)

Zur genauen pI-Bestimmung wurde radioaktiv markiertes TBG fokussiert und das Gel anschließend in kleine Scheibchen geschnitten und diese in Aqua dest. eingelegt. Radioaktivitäts- und pH-Messungen lieferten die Daten.

2.2.4.1.3. Durchführung im Flachbett

Aus Rationalitätsgründen und wegen der besseren Vergleichbarkeit verschiedener Proben wurden die meisten Versuche mittels der Flachbettechnik (thin layer PAG IEF) durchgeführt (94,113). Beiden Desialisierungsversuchen und Screening-Untersuchungen bot sie den Vorteil, daß für eine große Anzahl von Proben die Bedingungen identisch waren und die Ergebnisse im Vergleich sicher beurteilt werden konnten.

Die Flachbettgele wurden selbst hergestellt (23,5x10,5x0,1cm)

Stammlösungen

T = 5% C = 3% Ampholinekonzentration = 2% (w/v)

Lsg 1	29,1g	Acrylamid
Lsg 2	0,9g	Bisacrylamid
Lsg 3	20,5g	Saccharose
Lsg 4	4mg	Riboflavin

Die Lösungen 1 - 4 wurden in 100ml Aqua dest angesetzt.

Ansatz

5ml Lsg 1
5ml Lsg 2
18,3ml Lsg 3
1,5ml Ampholine^R 40% (w/v)
0,4ml Lsg 4

Anodenlösung: 0,01M H_3PO_4

Kathodenlösung: 0,01M NaOH

Diese Gellösung wurde zwischen zwei dünne Glasplatten gespritzt, wobei ein zwischengelegtes umlaufendes Gummiband (1mm dick) als Abstandhalter und Dichtung fungierte. Klammern erzeugten über außenanliegende dicke Glasplatten den nötigen Anpreßdruck. Zur Polymerisationsbeschleunigung wurde diese Anordnung für ca. 30 min. in den Strahlengang einer UV-Lampe gebracht, da der hier verwendete Katalysator Riboflavin zur Aktivitätsentfaltung UV-Licht benötigt.

Anschließend wurden alle Glasplatten einschließlich Dichtring vorsichtig entfernt ohne zwischen der verbleibenden Trägerglasplatte und dem Flachbettgel Luftblasen entstehen zu lassen. Petroleumbenzin stellte den gut wärmeleitenden Kontakt zwischen Trägerglasplatte und Kühlplattform der LKB-Elektrophoresekommer Multiphor^R 2117 her. Die mit Kathoden-bzw. Anodenlösung getränkten Elektrodenstreifen wurden auf die Gelränder der gegenüberliegenden Längsstreifen gelegt. Über einen passenden Deckel mit eingearbeiteten Stromleitern wurde die Verbindung zum Steuergerät hergestellt.

In einem halbstündigen Vorlauf unter gradueller Anhebung der Spannung von 100V auf 500V bildete sich der pH-Gradient aus. Die Probe (10-20 μ l, 0,1-4 μ g je nach Proteinzusammensetzung) wurde über Filterpapierstreifen (10x5mm) appliziert. Wegen möglicher Beeinträchtigung des pH-Gradienten sollten die Filterstücke an

der Gelstelle aufgelegt werden, an der das gesuchte Protein nicht erwartet wird (hier: 1cm vom anodalen Rand entfernt). Die Filter können belassen oder nach einer Stunde entfernt werden.

Die Auftrennbedingungen waren: max. 1.000V, 20W, 10°C

2 Stunden Laufzeit

2.2.4.1.4. Sichtbarmachung

2.2.4.1.4.1. Färbung im Gel

Nach Fixierung können die Proteine im Gel gefärbt werden.

Fixierung:	3,5g	Sulfosalicylsäure
	11,5g	Trichloressigsäure

Färbung:	0,115g	Coomassie-Brilliant-Blue R250
----------	--------	-------------------------------

Entfärbung:	25ml	Äthanol
	8ml	Eisessig

Konservierung:	10ml	Glycerin	Sämtliche Lösungen ad
	23ml	Äthanol	100ml Aqua dest.
	7ml	Eisessig	

60 min. in Fixierlösung

30 min. in Entfärberlösung

10 min. in Färberlösung

12 Std. in Entfärberlösung

60 min. in Konservierlösung

2.2.4.1.4.2. Immunfixation

Durch Anwendung der Immunfixation zur Sichtbarmachung wird das Auftrennvermögen der IEF kombiniert mit der Spezifität immunologischer Reaktionen.

Da die zu fokussierenden Substanzen an ihrem pI auf relativ engem Raum (Geldicke 1mm) zusammengedrängt werden, befindet sich eine ausreichende Menge an und nahe der Oberfläche, so daß die unten beschriebene 'Abklatschtechnik' in Anlehnung an ein von Cleve et al (16,17) beschriebenes Verfahren zur Anwendung kommen konnte.

2.2.4.1.4.2.1. Prinzip

Das Prinzip der 'Abklatschtechnik' besteht darin, daß bei geeigneter Wahl des Trägermaterials hinsichtlich seiner Porengröße die Diffusion von Antigen (Ag) und Antikörper (Ak) möglich ist, Antigen-Antikörperkomplexe aus sterischen Gründen jedoch ortsfest bleiben. Bringt man nun eine Ak-haltiges Trägermaterial entsprechender Porengröße in Kontakt mit einer Ag-haltigen Oberfläche (z.B. PAG nach IEF), diffundieren sowohl Ag als auch Ak nach dem Konzentrationsgefälle in die benachbarten Medien und reagieren dort bei entsprechenden Konzentrationen miteinander zu nicht weiter diffusionsfähigen Ag-Ak-Komplexen.

Hat man es mit schmalen IEF-Banden auf einer PAG-Oberfläche zu tun, so entstehen aufgrund randnaher Diffusionsvorgänge etwas breitere Banden auf dem Ak-Trägermedium. Das Ergebnis ist also die mit der Spezifität immunologischer Reaktionen vorgenommene Selektion einer Substanz und deren ortsfeste Übernahme auf ein neues Medium, welches nach Spülmaßnahmen ansonsten substanzfrei ist. Dadurch kann zur Sichtbarmachung der selektierten Substanz ein unspezifisches Färbeverfahren angeschlossen werden.

2.2.4.1.4.2.2. Durchführung

Eine halbe Stunde vor Fokussierende wurde ein Cellulose-Acetat-Streifen (30x5cm, Fa. Millipore ESW P 050 F0) in TBG-Antiserum, 1:5 verdünnt mit 0,05M Natriumphosphatpuffer pH 7,4, getränkt. Nach kurzem Antrocknen wurde der Streifen für 3-4 min. vorsichtig auf das Flachbett gelegt. Zur Entfernung unspezifisch haftender Proteine wässerte man den Streifen für ca. 12-15 Stunden. Anschließend konnten die verbleibenden Ag-Ak-Komplexe durch Färben des Streifens sichtbar gemacht werden.

Färbelösung: 0,5g Coomassie-Brilliant-Blue R250
 in 100ml Entfärbelösung

Entfärbelösung: 45ml Methanol
 9ml Eisessig
 ad 100ml Aqua dest.

10-15 min. färben

20-30 min. entfärben

trocknen

2.2.4.2. Präparative isoelektrische Fokussierung

2.2.4.2.1. Prinzip

Die Trägerampholyten, die den pH-Gradienten aufbauen, sind die gleichen, die zur analytischen IEF verwendet werden. Als Trägergel dient Sephadex G-75, welches zur Verminderung des elektrosmotischen Flusses speziell gereinigt ist (Ultradex^R) und zur Elektrophorese einen definierten Feuchtigkeitsgehalt aufweisen muß. Es können mit der unten beschriebenen Anordnung maximal 80-160mg Protein fokussiert werden (112).

2.2.4.2.2. Durchführung

4,0g Ultradox^R in 100,0ml Aqua dest. eine Stunde quellen lassen. 5ml Trägerampholyten (40% w/v) zugeben, so daß die Endkonzentration der Ampholyten größer als 2% ist.

Elektrodenstreifen, getränkt in 5% Ampholinlösung (Gesamtkonzentration 2% w/v), wurden an den Schmalseiten in einen Trog (235x110x5mm) gelegt, in den dann die Ampholyten-Ultradox-Suspension gegossen wurde.

Nach Verdunstung von exakt 27,0% des Gelfeuchtgewichts konnte die Fokussierung beginnen. Damit die einzelnen TBG-Fractionen möglichst weit voneinander entfernt zu liegen kamen, sollte der pH-Bereich möglichst klein sein. Der pI der TBG-Fractionen liegt zwischen 4,1 und 4,6. Da der kleinste kommerziell erhältliche pH-Bereich 3,5-5,0 betrug, entschloß man sich, diesen Bereich aufzuspreizen, indem eine proteinfreie Ultradox-Ampholine-Suspension (pH 3,5-5,0) unter normalen Bedingungen fokussiert wurde. Durch Entnahme der zwei mittleren Viertel und neuerlicher Fokussierung über die Gesamtstrecke des Troges gelang es, einen stabilen linearen pH-Gradienten von 4,0 bis 4,9 zu erhalten. Nach nochmaliger exakter Einstellung der Gelfeuchtigkeit wurde mittels eines Applikators die Probe eingebracht (Volumen: 3ml, Masse: 5-10mg präp. TBG, Ampholytenkonzentration: 2%).

Die Laufbedingungen für ca. 14-16 Stunden waren: max. Spannung: 1.000V, max. Leistung: 8W, konstante Temperatur: 10°C.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde mittels eines Rasters das Gel in 30 gleich große (7x110mm) Anteile parzelliert, welche getrennt in 5ml-Einmalspritzenzylinder mit geeigneter Fritte gegeben wurden. Die elektrofokussierten Substanzen, die sich in den betreffenden Gelabschnitten befanden, wurden gemeinsam mit den Trägerampholyten mit 3ml Aqua Bidest eluiert.

Die einzelnen TBG-Fractionen wurden im TBG-RIA nachgewiesen und quantifiziert, der pH-Wert und damit der pI der Fractionen wurde durch pH-Messung des Eluats bestimmt.

2.2.5. Desialisierung

2.2.5.1. Hydrolytische Spaltung des TBG

2.2.5.1.1. Prinzip

Diese unspezifische Art der Desialisierung wurde gewählt, um schnell und vollständig sämtliche NANA freizusetzen. Das Protein wurde dabei hydrolytisch komplett gespalten, so daß es für weitere Untersuchungen nicht mehr zur Verfügung stand. Das Freisetzen der NANA selbst war nötig, damit es im Warren-Assay (107) nachgewiesen werden konnte.

2.2.5.1.2. Durchführung

Die reine TBG-Lösung, welche keine anderen Glykoproteine enthalten darf, wurde in 0,1N H₂SO₄ (Endkonzentration) bei 80°C für eine Stunde inkubiert (Saure Hydrolyse).

2.2.5.2. Enzymatische Abtrennung von N-Acetylneuraminsäure (NANA)

2.2.5.2.1. Prinzip

Die enzymatische Desialisierungsmethode wurde gewählt, um möglichst schonend für das Gesamtprotein die endständigen NANA isoliert abzuspalten. Die verwendeten Neuraminidasepräparationen (EC 3.2.1.18) sind in unterschiedlichem Ausmaß in der Lage, N-Acetylneuraminyreste aus 2→3- und 2→6-Bindungen an β -D-Galaktopyranosylresten zu spalten. Mehrfach acetylierte Neuraminsäuren können nicht abgespalten werden.

Es kamen folgende Enzympräparationen zur Anwendung (19):
Präparationen von

- Clostridium perfringens (9,10) der Fa. Boehringer
(Aktivität: 0,6U/mg; Substrat: Mucin; Temperatur: 37°C)
- Vibrio Cholerae (1) der Fa. Behring
(20U/mg; humanes α_1 -saures Glykoprotein; 37°C)

- Vibrio Cholerae der Fa. Calbiochem
(20U/mg; humanes ϕ_1 -saures Glykoprotein; 37°C)
- Influenza-Virus (65,81) der Fa. Calbiochem
(1,6U/mg; N-Acetylneuraminyllaktulose; 37°C)

2.2.5.2.2. Durchführung

Komplette Desialisierungen wurden mit Enzympräparationen von Clostridium perfringens (Fa. Boehringer), Vibrio Cholerae (Fa. Behring bzw. Calbiochem) und Influenza-Virus (Fa. Calbiochem) durchgeführt. Aus Praktikabilitätsgründen wurde immer im Natriumacetatpuffer pH 5,6 inkubiert, obwohl sich die pH-Optima der einzelnen Präparationen etwas unterscheiden (1,9,10,24,65,81). Die Vibrio Cholerae-Präparationen benötigen Ca^{++} - und Mg^{++} -Ionen (10).

Ansatz

50 μ l 0,1M Natriumacetatpuffer pH 5,6
50 μ l 1g% TBG-Lösung (= 0,8nmol)
50 μ l 1g% Enzympräparation in obigem Puffer

Im Ansatz der Vibrio Cholerae-Neuraminidase wurden zusätzlich 5mM CaCl_2 und 5mM MgCl_2 gelöst.

Inkubation 12-48 Stunden bei 37°C, anschließend
50 μ l 0,15M Glycin-NaOH-Puffer pH 11,0 $\rightarrow$ pH 10,3

Die kinetischen Desialisierungsversuche wurden ausschließlich mit der Enzympräparation von Clostridium perfringens durchgeführt, da sich diese Präparation problemlos handhaben läßt, keine Ionenzusätze erforderlich sind (10) und das Enzym im Gegensatz zum Derivat von Influenza-Virus durch freigesetzte NANA nicht gehemmt wird (10,81).

Ansatz

50 μ l 0,1M Natriumacetatpuffer pH 5,6

50 μ l 1g% TBG-Lösung (= 0,8 nmol)

20 μ l 2mg% - 1g% Enzympräparation in obigem Puffer

Inkubation 2 min - 24 Stunden bei 37°C, anschließend

50 μ l 0,15M Glycin-NaOH-Puffer pH 11,0 $\rightarrow$ pH 10,3 und Gefrieren bei -20°C zum Stoppen der Enzymreaktion.

Zur Hemmung eventueller Proteasen, welche nach Literaturberichten Neuraminidasepräparationen kontaminieren können, wurden Kontrollinkubationen mit Zusätzen von Proteaseninhibitoren (Aprotinin, Endkonzentration 3.450 KIE/ml bzw. 10% Aminosäurenlösung zur Produkthemmung, Endkonzentration 17mg/ml bzw. die Kombination von beiden) angelegt.

2.2.6. Nachweis von N-Acetylneuraminsäure (Warren-Assay)

Der quantitative Nachweis der N-Acetylneuraminsäure wurde entsprechend der Vorschrift von L. Warren durchgeführt (107). Zu beachten ist dabei, daß nur einfach acetylierte Neuraminsäuren, aber auch 2-Desoxyzucker in den Assay eingehen. Letztere können nach Photometrierung bei einer zweiten Wellenlänge mathematisch eliminiert werden.

2.2.6.1. Prinzip

Freie, nicht gebundene N-Acetylneuraminsäure wird durch Natriummetaperjodat oxidiert und zur Entwicklung eines Farbkomplexes an 2-Thiobarbitursäure gekoppelt. Zwischen diesen beiden Schritten muß das überschüssige Perjodat mit Natriumarsendioxid inaktiviert werden. Zur Intensivierung der Farbentwicklung wird der NANA-Thiobarbitursäurekomplex durch Ausschütteln in Cyclohexanon ge-

löst und in dieser Phase photometriert (Optimum bei 549 nm). Durch Interpolation auf einer Standardextinktionskurve, welche mit eingewogenen NANA-Massen erstellt wird, kann die NANA-Konzentration der Probe ermittelt werden.

2.2.6.2. Durchführung

Sämtliche Lösungen wurden bevorzugt im warmen Milieu bereitet. Sie sind bei Raumtemperatur mindestens 1 - 2 Monate haltbar.

Stammlösungen

Lsg 1	0,2M	NaJO ₄ in 9M H ₃ PO ₄
Lsg 2	10% (w/v)	NaAsO ₂ in 0,1N H ₂ SO ₄ , 0,5M NaSO ₄
Lsg 3	0,6% (w/v)	2-Thiobarbitursäure in 0,5M NaSO ₄
Lsg 4		Cyclohexanon pa

Ansatz

- 100 µl Probe bzw. Standard (Eichkurve) bzw. H₂O (Leerwert)
- 25 µl Lsg 1, 20 min. schütteln bei Raumtemperatur
- 250 µl Lsg 2, schütteln bis Mischlösung klar
- 750 µl Lsg 3, kurz schütteln, anschließend Inkubation
 - 15 min bei 100°C
 - 5 min bei 0°C
 - 5 min bei Raumtemperatur
- 1ml Lsg 4, kurz schütteln, zentrifugieren (3 min, 300g)

$$E = E_{\text{Probe}} - E_{\text{leer}} \quad (\text{Photometrie bei } 546\text{nm}, \text{ Meßbereich: } 10 - 500 \text{ mol/l})$$

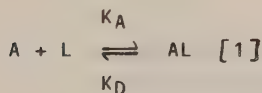
Da NANA-Messungen nur mit isoliertem TBG vorgenommen wurden, konnte auf die photometrische (532nm) und mathematische Berücksichtigung eines 2-Desoxyriboseanteils verzichtet werden.

2.2.7. Bestimmung der Assoziationskonstanten mit Hilfe des Scatchard Plots

Frischisoliertes, weitgehend natives TBG, seine einzelnen Mikroheterogenitätsfraktionen und teilweise bzw. vollständig desialisiertes TBG wurden auf ihre Affinität zu I_4 , ausgedrückt durch die Assoziationskonstante K_A untersucht. Sie kann mit Hilfe des Scatchard Plots berechnet werden (25,87,88,89,110). Darüberhinaus kann die maximale Bindungskapazität von TBG für I_4 ermittelt werden.

2.2.7.1. Definition der Assoziationskonstante K_A

Für jede chemische Reaktion gilt strenggenommen folgende Beziehung:



Es sei: A und L die Reaktanten

AL das Reaktionsprodukt

K_A die Assoziationskonstante, den Reaktionsablauf von links nach rechts beschreibend

K_D die Dissoziationskonstante, den Reaktionsablauf von rechts nach links beschreibend

Hat sich bei einem bestimmten Druck und einer bestimmter Temperatur ein Gleichgewicht zwischen Hin- und Rückreaktion eingestellt, gilt das Massenwirkungsgesetz (MWG) von Guldberg und Waage:

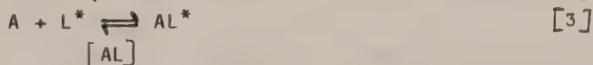
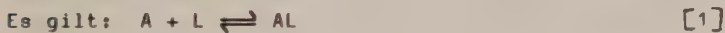
$$\frac{[AL]}{[A] \times [L]} = K [2]$$

Es sei: $[AL]$ die Konzentration des Reaktionsprodukts $[mol/l]$
 $[A]$ und $[L]$ die Konzentrationen der Reaktanten
 K die Gleichgewichtskonstante $[1/mol = M^{-1}]$, die hier
 gleich der Assoziationskonstante ist.

$$\text{Es gilt auch } K_A = \frac{1}{K_D}$$

2.2.7.2. Herleitung des Scatchard Algorithmus

Zur Bestimmung der Assoziationskonstante der Bindung von kleinen Molekülen (Ligand L) an Makromoleküle (Akzeptor A) mit je n Bindungsstellen wird üblicherweise ein Teil der kleinen Moleküle radioaktiv markiert.



MWG:
$$\frac{[AL]}{n \times [A] \times [L]} = K_A$$
 [2]

$$\frac{[AL^*]}{n \times [A] \times [L^*]} = K_A^* \quad [4]$$

Da sich radioaktive und nicht radioaktive Elemente gleicher Ordnungszahl nur hinsichtlich physikalischer, nicht aber chemischer Eigenschaften unterscheiden, gilt:

$$K_A = K_A^*$$

In einem Inkubationsgemisch mit teilweise markierten und nicht markierten Liganden gilt:

$$\frac{[AL] + [AL^*]}{n \times [A] \times ([L] + [L^*])} = K_A \quad [5]$$

Dabei ist:

$$\begin{aligned} [AL] + [AL^*] &= [\text{gebundener Ligand}] = [\text{Bound}] \\ [L] + [L^*] &= [\text{freier Ligand}] = [\text{Free}] \end{aligned}$$

Gleichung [5] umgeformt ergibt:

$$\frac{[\text{Bound}]}{[\text{Free}]} = K_A (n \times [A]) \quad [6]$$

Der freie Akzeptor ist aber der insgesamt im Ansatz befindliche minus dem gebundenen Akzeptor:

$$n \times [A] = n \times [A]_{\text{gesamt}} - [\text{Bound}] \quad [7]$$

Gleichung [7] in Gleichung [6] ergibt den Scatchard Algorithmus (87):

$$\frac{[\text{Bound}]}{[\text{Free}]} = K_A \times (n \times [A]_{\text{gesamt}} - [\text{Bound}]) \quad [8]$$

Gemäß Gleichung [8] kann die Assoziationskonstante bestimmt werden, indem man die Gesamtkonzentration des Akzeptors konstant läßt und diejenige des Liganden ändert. Steigende Ligandenkonzentrationen haben steigende Bound- als auch steigende Free-Konzentrationen zur Folge. Läßt man nun die markierte Ligandenkonzentration auch konstant und ändert nur die Konzentration des nicht markierten Liganden, werden die markierten von kalten Liganden

mehr oder weniger verdrängt, es ändert sich der Quotient Bound/Free. Es muß nur beachtet werden, daß die Gesamtkonzentration des Liganden diejenige an Akzeptorbindungsstellen jederzeit deutlich überschreitet.

2.2.7.3. Prinzip des Scatchard Plots

Wählt man in Gleichung [8]

$$y = \frac{[\text{Bound}]}{[\text{Free}]} \text{ und } x = [\text{Bound}], \text{ d.h. trägt man } \frac{[\text{Bound}]}{[\text{Free}]} \text{ als}$$

Funktion von $[\text{Bound}]$ graphisch auf, so erhält man:

$x = 0 = y = K_A \times n \times [A]_{\text{gesamt}}$, d.h. Schnittpunkt des Graphen mit der y-Achse ist $K_A \times n \times [A]_{\text{gesamt}}$

$y = 0 \iff x = n \times [A]_{\text{gesamt}}$, d.h. Schnittpunkt des Graphen mit der x-Achse ist Anzahl der Bindungsstellen pro Akzeptor multipliziert mit Akzeptorkonzentration, also Konzentration aller Bindungsstellen und damit maximale Bindungskapazität. Durch entsprechende Division erhält man die Assoziationskonstante K_A .

Ist $n = 1$, d.h. hat der Akzeptor nur eine Bindungsstelle für den Liganden, erhält man in der graphischen Darstellung eine Gerade mit der Steigung $- K_A$.

Ist $n = 2$, d.h. gibt es am Akzeptor mehr als eine Bindungsstelle für den Liganden, ergibt sich eine Kurve, aus der die Assoziationskonstanten nicht direkt ablesbar sind.

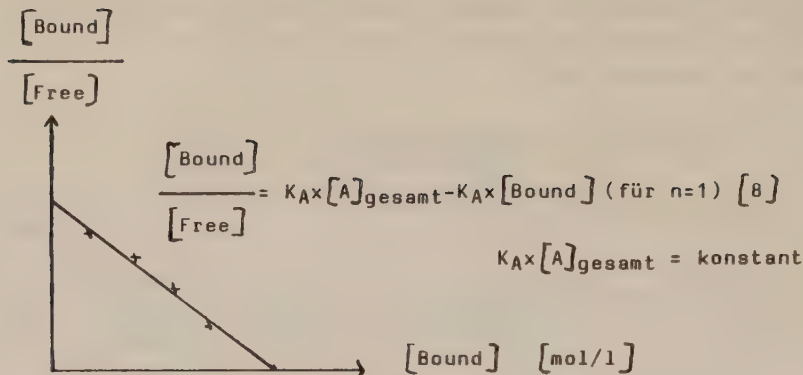


Abb. 1: Scatchard Plot für $n = 1$

(=graphische Darstellung des Scatchard Algorithmus)

Ordinate: Verhältnis von gebundenem zu freiem radioaktiv markiertem Liganden

Abzisse: Konzentration an gebundenem Liganden [mol/l]

Jeweils gleiche Mengen an Akzeptor werden mit konstanter Menge an radioaktiv markiertem Ligand und mit variablen (meist einer geometrischen Verdünnungsreihe folgenden) Konzentrationen an nicht markiertem Ligand inkubiert. Nach Einstellung des Äquilibrium werden die Bound- und Free-Anteile mit geeigneten Methoden (s. 3.2.7.4.) getrennt. Im Zählgerät gemessen werden die Radioaktivitäten der markierten Liganden (frei oder gebunden), die stellvertretend für alle Liganden (markiert und kalt) stehen.

Bekannt sind:

-- Konzentration von radioaktivem Ligand $[L^*]$ (für gesamte Meßreihe konstant; errechnet aus spezifischer Aktivität von $[L^*]$)

-- Konzentration von nicht markiertem Ligand $[L]$ (variiert von Meßpunkt zu Meßpunkt meist in geometrischer Verdünnungsreihe ausgehend von bekanntem Stockstandard)

- Konzentration vom Akzeptor $[A]_{\text{gesamt}}$ (wenn für die gesamte Meßreihe konstant, kann $[A]_{\text{gesamt}}$ auch unbekannt sein; in diesem Fall kann n = Anzahl der Bindungsstellen nicht bestimmt werden)
- Bound- bzw. Free-Anteile (Radioaktivitäten stellvertretend für Ligandenkonzentrationen, gemessen im Zählgerät)
- Gesamtaktivität des heißen Liganden im Meßansatz (zur Bestimmung der unspezifischen Bindung, gemessen im Zählgerät)

Damit kann Gleichung [8] nach K_A und n aufgelöst werden, zu deren Bestimmung es der Bestimmung von $n+1$ Meßpunkten bedarf.

Bei der praktischen Durchführung ist es häufig notwendig, die unspezifische Bindung zu berücksichtigen, die hauptsächlich durch Tracerverunreinigungen bzw. durch unspezifische Adsorptionen im Meßmilieu verursacht wird und den theoretisch richtigen Bound/Free-Quotienten verfälscht.

2.2.7.4. Zum Vorgang der Bound-Free-Trennung

Dazu bedarf es einiger grundsätzlicher Überlegungen:

Da die Bindung zwischen Ligand und Akzeptor $A + L \rightleftharpoons AL$ [1] im biochemischen Bereich meist nicht kovalenter, sondern ionischer Natur ist, ist sie besonders leicht störbar und gehorcht nur dem Massenwirkungsgesetz MWG (s. 3.2.7.1.). Das sich einstellende Gleichgewicht ist ein dynamisches, wobei ständig Assoziation und Dissoziation von Ligand und Akzeptor ablaufen. Zur Vermeidung systemischer Fehler ist es daher notwendig, über eine Bound-Free-Trennungsmethode zu verfügen, welche das bestehende Gleichgewicht möglichst wenig stört. Unter den bekannten Trennungsmethoden (Elektrophorese, Gelfiltration, Ultrafiltration, Zentrifugation u.a.) erfüllt dieses Kriterium allein die Äquilibriumsdialyse, die aus diesem Grund bevorzugt für Bindungsstudien verwendet wird.

2.2.7.5. Äquilibriumsdialyse

2.2.7.5.1. Prinzip

Die Äquilibriumsdialyse wurde zur Untersuchung des T_4 -TBG-Bindungsverhaltens herangezogen, weil sie als einzige Methode eine theoretisch störungsfreie Bound-Free-Trennung gestattet (s. 3.2.7.4.), indem auf eine Bound-Free-Trennung im wörtlichen Sinn verzichtet und diese mittels indirekter Daten rechnerisch vorgenommen wird (109). Dazu steht das eigentliche Inkubationskompartiment, in dem die Reaktion $A + L \rightleftharpoons AL$ abläuft, über eine semipermeable Membran mit einem zweiten, dem Indikatorkompartiment in Verbindung, welches die Aufgabe hat, die Konzentration des freien Liganden im Inkubationskompartiment anzuzeigen. Die Diffusion des Liganden durch die Membran soll also dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz folgend so lange ablaufen, bis nach erfolgter Gleichgewichtseinstellung der Reaktion $A + L \rightleftharpoons AL$ auch die Konzentration des freien Liganden auf beiden Seiten der Membran gleich ist. Dies setzt voraus, daß die Membran für den Liganden möglichst gut, für den Akzeptor aber undurchlässig ist. Dabei spielen sowohl die Molekulargrößen, als auch die Polaritäten der Reaktanten im Vergleich zur Membran eine Rolle.

Daraus ergeben sich drei Konsequenzen:

- Ligand und Akzeptor müssen sich in mindestens einem der Ausschlußkriterien deutlich voneinander unterscheiden (hier: Molekulargröße)
- Es besteht die Möglichkeit der Adsorption von Ligand und/oder Akzeptor an die Membran mit erheblichen Verfälschungen hinsichtlich der Einstellung des dynamischen Gleichgewichts (s.3.2.7.3.)
- Zur Vermeidung eines Membranpotentials aufgrund eines "Gibbs-Donnan"-Ungleichgewichts durch die nicht diffusiblen Akzeptormoleküle müssen entsprechende Pufferlösungen verwendet werden.

Zur rechnerischen Bound-Free-Trennung bestimmt man (bei Einsatz von radioaktiv markiertem Liganden) die Radioaktivität im Inkubationskompartiment (gebundener + freier Ligand = $B + F$) und im Indikatorkompartiment (freier Ligand = F). Der Bound-Anteil ergibt sich durch entsprechende Subtraktion.

2.2.7.5.2. Beschreibung der Versuchsanordnung

Die Äquilibriumsdialyse wurde mit dem Gleichgewichtsdialysegerät Dianorm^R durchgeführt, welches die gleichzeitige Inkubation in 20 Dialysierkammern gestattet (108,109). Eine Inkubationseinheit besteht aus zwei Teflonhalbscheiben, in die jeweils ein zylindrischer Hohlraum ($F = 2 \text{ cm}^2$, $H = 1,25 \text{ mm}$, $V = 250 \mu\text{l}$) so eingearbeitet ist, daß beim Zusammenfügen kommunizierender Scheiben eine einzige Kammer entsteht. Wird beim Zusammenbau zwischen die Scheiben eine semipermeable Membran gespannt, hat man es je nach den Eigenschaften der inkubierten Moleküle in bezug auf die Membran mit einer oder zwei Kammern zu tun. Jede der Zellenhälften verfügt über eigene verschließbare Einfüll-, Entlüftungs- und Entleerungsbohrungen.

Über zwischengelagerte Federpreßadaptoren werden je fünf Dialysezellen so zu einem Block verspannt, daß der Anpreßdruck die Kammern abdichtet. Ein bis vier solcher Blöcke können im Antriebsgehäuse eingesetzt und in Rotation versetzt werden.

Als semipermeable Membranen wurden aufgeschnittene Visking-Dialysierschläuche (Typ 20/32) aus regenerierter Zellulose mit 0,02 mm Wandstärke verwendet. Nach dem Vorquellprozeß (s.3.2.7.5.3.) hatten die Poren der Membran einen Durchmesser von 48 Å und waren damit durchlässig für niedermolekulare T_4 -Moleküle (MG 777), nicht aber für TBG (MG ca. 60.000).

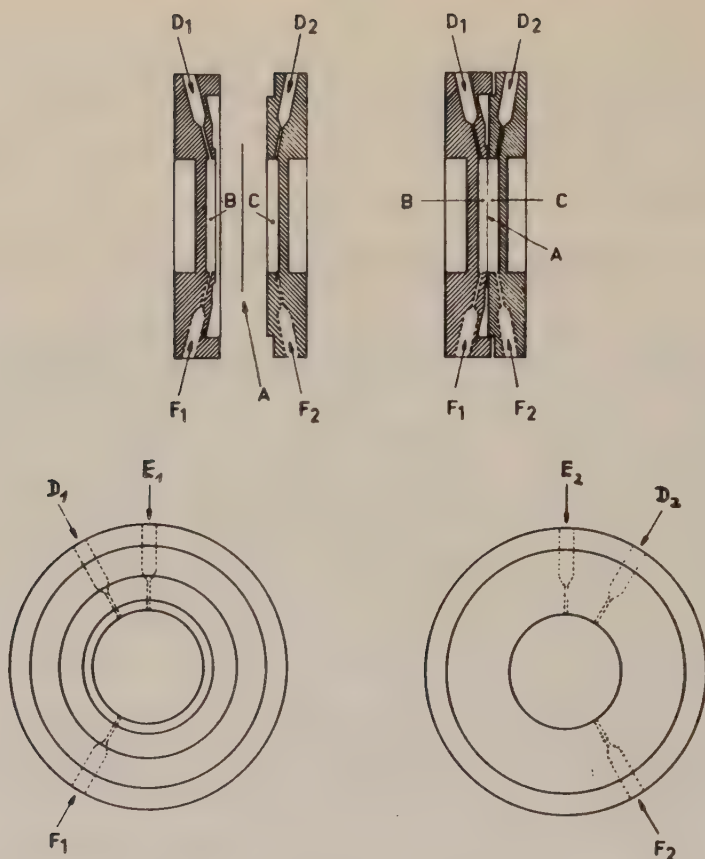


Abb. 2: Graphische Darstellung einer Dialysierzelle.

Zwei Zellenhälften aus Teflon bilden eine Kammer, die durch die semipermeable Membran A in zwei Hälften B und C getrennt wird. In jede Kammerhälfte führen verschließbare Bohrungen: Einfüllbohrungen D₁ und D₂, Entlüftungsbohrungen E₁ und E₂ und Entleerungsbohrungen F₁ und F₂.

2.2.7.5.3. Durchführung

2.2.7.5.3.1. Reinigung des I₄-Tracers

Zur Vermeidung von Verfälschungen beim Rückschluß von Radioaktivität auf I₄-Konzentration mußte das ¹²⁵J-markierte I₄ nachgereinigt werden, um allfällige Verunreinigungen durch freies ¹²⁵J, I₃ bzw. ¹²⁵J-markiertes I₃ zu beseitigen. Nach dem Markierungsvorgang, der bereits eine Reinigungsphase nach dem Prinzip der Molekularsiebchromatographie einschloß, erfolgte die Nachreinigung durch eine Adsorptionschromatographie auf einer LH-20-Säule (= hydroxypropyliertes Sephadex G-25) (s.3.2.7.3.) Die gepackte 2ml-LH-20-Säule wurde mit reinem Äthanol und Tris-HCl-Puffer 0,1 M pH 7,4 vorgespült. Danach wurden 3 ml ¹²⁵J-markiertes I₄, gelöst in 0,1 N HCl, 20 % Propylenglykol, aufgetragen und die Säule mit dem Zehnfachen ihres Volumens mit Tris-HCl-Puffer 0,1 M pH 7,4 gespült. Der I₄-Tracer wurde mit reinem Äthanol eluiert, welches man anschließend verdampfen ließ. Das Pellet wurde in Tris-HCl-Puffer 0,05 M pH 8,6 so gelöst, daß die Aktivität ca. 20.000 cpm/100 µl betrug.

Die Reinheit des I₄-Tracers wurde durch Fällung mit I₄-Antikörper im Überschuß überprüft, d.h. die gesamte Radioaktivität der eingesetzten Probe mußte sich im Pellet wiederfinden.

2.2.7.5.3.2. Vorbereitung der Membranen

Nach entsprechendem Zuschnitt wurden die Membranstücke für 20 min in Aqua bidest., anschließend für 10 min in Äthanol pa 25%, dann für 15 min in Aqua bidest. und schließlich für 15 min in Tris-HCl-Puffer 0,2 M pH 8.6 eingelegt. Sämtliche Quellösungen wurden während der Einlegezeit zwei- bis dreimal gewechselt. Das penible Einhalten obiger Vorschrift war notwendig, da v.a. zu hoher Alkoholgehalt oder zu langes Einlegen darin zur Schrumpfung und zu unkontrollierter Porenverengung geführt hätten (108).

Nach Abstreifen überschüssigen Puffers wurden die feuchten, aber nicht tropfnassen Membranen (Cave: Volumenfehler) auf je eine Teflonscheibe gelegt und durch sofortiges Bedecken mit einer kommunizierenden Scheibe vor dem Austrocknen bewahrt. Über zwischengeschaltete Federelemente wurden je fünf Dialysezellen zu einem Block verspannt.

2.2.7.5.3.3. Versuchsdurchführung

Nach Verschuß der Auslaßbohrungen wurden die Kammern gefüllt:

1. Kammerhälfte: Je 200 μ l IBG (3-6 nmol/l) in Puffer
2. Kammerhälfte: Je 100 μ l I₄-Tracer (20.000 + 5.000 cpm) in Puffer
+ Je 100 μ l I₄-Standard (0-4-8-16-32-64 nmol/l) in Puffer

Jeweils dreifacher Ansatz für jede I₄-Standardkonzentration.

Puffer: Tris-HCl-Puffer 0,2 M pH 8,6 + NaN₃ 0,01 M.

Die verschlossenen Kammern wurden im Dianormapparat für 15-20 Std. bei 4°C in kontinuierliche Rotation (12Upm) versetzt. Nach Entleerung der einzelnen Zellenhälften über die Auslaßbohrungen wurden Aliquots von 100 μ l (wegen unvollständiger Entleerung) zur Radioaktivitätsmessung gegeben.

2.2.7.5.3.4. Qualitätskontrollen

Die Wiederfindung ($2 \times (100 \mu\text{lKammer } 1 + 100 \mu\text{lKammer } 2)$) wurde durch Vergleich mit der eingesetzten Aktivität (100 μ l I₄-Tracer) für jede Dialysezelle bestimmt (s.3.2.7.3. bzw.3.2.7.5.1.). Die Raten lagen zwischen 88% und 98% mit einem Mittelwert von 93.5%. Die in die Berechnung eingesetzte I₄-Standardkonzentration wurde mit der für jede Dialysezelle ermittelten Wiederfindungsrate korrigiert in der Vorstellung, daß sich kaltes und heißes I₄ gleich verhalten und der nicht wiedergefundene Anteil vermutlich wegen Membranadsorption für die Gleichgewichtseinstellung nicht zur Verfügung stand (s.3.2.7.5.4.).

Die Gleichgewichtseinstellung wurde überprüft hinsichtlich

- a) der Inkubationszeit und
- b) des "Gibbs-Donnan"-Ungleichgewichts:

zu a) 1. Kammerhälfte: Je 200 μ l Puffer
2. Kammerhälfte: Je 100 μ l I_4 -Tracer (20.000 + 5.000 cpm) +
Je 100 μ l Puffer

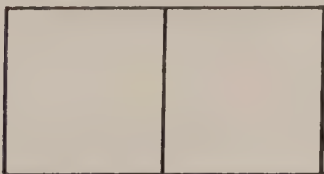
zu b) 1. Kammerhälfte: Je 200 μ l Gammaglobulin (3-6 nmol/l) in
Puffer
2. Kammerhälfte: Je 100 μ l I_4 -Tracer (20.000 + 5.000 cpm)
+ Je 100 μ l Puffer

zu a) In jedem Versuchslauf wurde zweifach überprüft, ob die Inkubationsbedingungen zur Ausbildung eines Gleichgewichts ausreichend waren.

zu b) Das mögliche Auftreten eines "Gibbs-Donnan"-Ungleichgewichts wurde durch mehrmalige Kontrollen ausgeschlossen und die Wahl des richtigen Puffers damit verifiziert.

2.2.7.5.4. Berechnung der Assoziationskonstanten

Hälfte 1 Hälfte 2



$$[B] + [F] = [I]$$

$$[F]$$

Inkubationskompartiment = Zellenhälfte 1 (mit TBG):

$$[B] + [F] = [I_4]_1$$

Indikatorkompartiment = Zellenhälfte 2 (ohne TBG):

$$[F] = [I_4]_2$$

Die Radioaktivitätsmeßwerte in counts per minute (cpm) entsprechen unbekannten T_4 -Konzentrationen. Da bei der Quotientenbildung die Benennung cpm ohnehin eliminiert würde, wurde sie der Einfachheit halber weggelassen.

$$\frac{[B]}{[F]} = K_A \times (n \times [A] - [B]) \quad [8] \quad (s.3.2.7.2.)$$

$$\text{Meßwert 1} = M_1 \hat{=} [T] = [B] + [F] \quad [9]$$

$$\text{Meßwert 2} = M_2 \hat{=} [F] \quad [10]$$

$$\Rightarrow [B] = ([B] + [F]) - [F] \hat{=} M_1 - M_2 \quad [11]$$

Gleichung [8] aufgelöst nach x und y ergibt: (s.3.2.7.3.)

$$x = \frac{[B]}{[T]} \times [T_4]_1 \quad [12]$$

$$[T_4]_1 = \frac{[T]}{[T] + [F]} \times [T_4]_{1+2} \quad [13]$$

Gleichungen [9] + [10] + [11] + [13] in [12] ergibt:

$$x = \frac{[B]}{[T]} \times \frac{[T]}{[T] + [F]} \times [T_4]_{1+2} \hat{=} \hat{=} \frac{M_1 - M_2}{M_1 + M_2} \times [T_4]_{1+2} \quad [14]$$

Durch Einführung der absoluten Konzentration $[T_4]_{1+2}$ in den Algorithmus erhält das Ergebnis die für T_4 -TBG zutreffende Dimension.

$$y = \frac{[B]}{[F]} \hat{=} \frac{M_1 - M_2}{M_2} \quad [15]$$

Die Gesamt-T₄-Konzentration im Ansatz ($[T_4]_{1+2}$) kann bestimmt werden und setzt sich zusammen aus den Konzentrationen an T₄, die im TBG, im T₄-Tracer und im T₄-Standard enthalten sind.

Da das TBG mit T₄ von der T₃-Sephärose abgelöst wurde (s.3.2.2.1.1.1.), war es T₄-gesättigt; der T₄-Gehalt wurde auf äquimolarer Basis errechnet. Der T₄-Gehalt des T₄-Tracers ergab sich mittels Rechnung aus der spezifischen Aktivität des Tracers. Der T₄-Gehalt des T₄-Standards wurde entsprechend der zellenspezifischen Tracerwiederfindungsrate korrigiert.

T₄ (TBG) ~ 0,5-1 pmol/200 µl

T₄ (Tracer) ~ 0,2-0,3 pmol/100 µl

T₄ (Standard) = 0 - 0,4 - 0,8 - 1,6 - 3,2 - 6,4 pmol/100 µl

multipliziert mit jeweiliger Wiederfindungsrate (0,88 - 0,98)

(s.3.2.7.5.3.4.)

Die numerische Berechnung der maximalen Bindungskapazität von TBG und der Assoziationskonstante T₄-TBG erfolgte alternativ mit einem Olivetti-Tischrechner nach eigenem Programm oder einer Siemens-Rechenanlage (404/3) (inklusive der graphischen Darstellung des zugehörigen Graphen).

3. Ergebnisse

3.1. TBG-Präparation

3.1.1. Affinitätschromatographie auf I₃-Epoxy-Sepharose 6B

3.1.1.1. TBG-Extraktion

Die TBG-Extraktionsrate durch die I₃-Sepharose war unterschiedlich in Abhängigkeit des Verfahrens. Wurde durch Schütteln von I₃-Sepharosegel in Humanserum extrahiert (Batch-Verfahren), konnten maximal 60% des Serum-TBG's an die Sepharose gebunden werden.

Weitaus höhere Extraktionsraten (bis 90%) ließen sich erzielen, indem das Serum über eine I₃-Sepharosesäule gepumpt wurde.

Säulenmaße: l = 10 cm, Innendurchmesser = 3 cm

Volumen: ca. 70ml I₃-Sepharose

Pumprate: 300 ml/h

800ml Poolserum von Schwangeren (mittlere TBG-Konzentration = 2,27mg%), 1:2 verdünnt mit Veronalpuffer 0,1M pH 8,8

TBG-Konzentration im Eluat = 0,27mg%

Extraktionsrate = 88%

Extrahierte Menge = 31mg

3.1.1.2. Waschschritte

Da neben der spezifischen Bindung von TBG viele andere Serumproteine unspezifisch an der I₃-Sepharose haften blieben, mußten zahlreiche Spülschritte vorgenommen werden, wobei aufgrund der hohen Bindungskräfte zwischen TBG und I₃-Sepharose Lösungen mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen bzw. pH-Werten zur Anwendung kommen konnten. Die verschiedenen Extinktionsanstiege bei der Photometerüberwachung des Eluats repräsentieren ausgespülte "Verunreinigungen" (Proteine), wobei in keinem Eluat abgelöstes TBG radioimmunologisch nachgewiesen werden konnte.

In zahlreichen Vorversuchen stellte sich heraus, daß die Abfolge unten aufgelisteter Spülpuffer das beste Reinigungsergebnis erbrachte:

Veronalpuffer 0,10M pH 8,8 + NaCl 0,9% 1M
Tris-HCl-Puffer 0,10M pH 8,6 + NaCl 0,9% 2M
Tris-HCl-Puffer 0,10M pH 8,6
Na-PO₄-Puffer 0,05M pH 6,8 + NaCl 0,9% 2M
Na-PO₄-Puffer 0,05M pH 6,8
Tris-HCl-Puffer 0,10M pH 8,6 + NaCl 0,9% 1M
Tris-HCl-Puffer 0,10M pH 8,6

Die spezifische Desorption von IBG erfolgte mit 400 ml
Tris-HCl-Puffer 0,10M pH 8,6 + I₄ 0,13 mM + Humanalbumin 0,1g%

Das hierzu verwendete Albumin wurde vorher auf einer kleinen Con A-Sepharose-Säule (Länge = 20cm, Innendurchmesser = 2cm, Volumen ca. 60ml) vorgereinigt, um die Präparation nicht sekundär mit Verunreinigungen zu kontaminieren.

Es wurde mit jedem Puffer so lange gespült, bis photometrisch die Null-Extinktion für die jeweilige Spüllösung erreicht war. Das hatte je nach aufgetragener Serummenge unterschiedliche Puffer-volumina zur Folge.

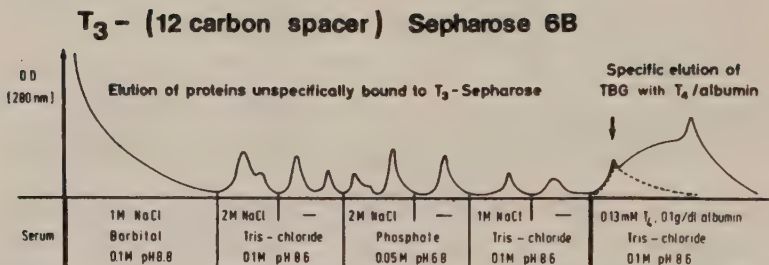


Abb.3: Erster Schritt der TBG-Präparation aus Humanserum.

TBG wurde durch Affinitätschromatographie auf einer T₃-Epoxy-Sepharose extrahiert. Unspezifisch gebundene Serumproteine wurden durch Spülung mit verschiedenen Pufferlösungen entfernt.

TBG wurde spezifisch eluiert mit einer T₄-haltigen Albuminlösung, welche vorher auf einer Con A-Sepharose vorgereinigt wurde.

Die schraffierte Zone markiert TBG (durch RIA gemessen).

Das hiermit gewonnene T₃-Sepharose-Eluat enthielt laut Disc-Elektrophorese nur noch TBG und Humanalbumin.

3.1.2. Con A-Sepharose 4B

Dieser Schritt diente dazu, das zur TBG-Desorption benötigte Albumin (Lösungsvermittler für I_4) wieder zu entfernen. Nach dem Auftragen (Säulenmaße: Länge = 50cm, Innendurchmesser = 3cm, Volumen ca. 350ml) wurde mit reichlich Tris-HCl-Puffer 0,05M pH 7,4 gespült (Photometerkontrolle), wobei sich in der Spül-lösung radioimmunologisch kein TBG nachweisen ließ.

Die Elution erfolgte mit demselben Puffer unter Zugabe von α -Methyl-D-Mannosid 0,03M.

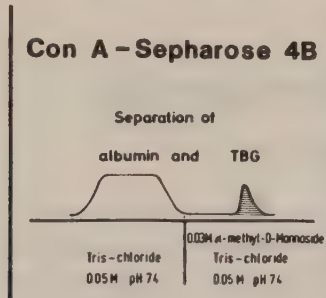


Abb. 4: Zweiter Schritt der TBG-Präparation aus Humanserum.

Entfernung von Albumin durch eine zweite Affinitäts-chromatographie auf Con A-Sepharose.

TBG wurde eluiert mit α -Methyl-D-Mannosid-Lösung, welche in der anschließenden Dialyse entfernt wurde.

Die schraffierte Zone markiert TBG (durch RIA gemessen).

3.1.3. Dialyse und Sephadex G-25 Coarse

Zur Entfernung von präparativ bedingtem NaCl und Mannosid wurden die TBG-haltigen Fraktionen auf Sephadex G-25 Coarse gereinigt (Säulenmaße: Länge = 70cm, Innendurchmesser = 3cm, Volumen ca. 480ml) und in einer Unterdruckkammer gegen Aqua bidest. eingeeengt.

Nach Tiefgefrieren und Lyophilisieren verblieben 21mg TBG auf der Waage.

Die Gesamtausbeute an TBG betrug in diesem repräsentativen Versuch nahezu 60%.

Sämtliche Spül- bzw. Elutionsfraktionen wurden mittels TBG-Kurzassay auf TBG-Verluste bzw. sammelwürdige Konzentrationen überprüft.

3.2. Reinheitsuntersuchungen des TBG

3.2.1. Disc-Elektrophorese

Zum Nachweis der Reinheit der Präparationen wurden überladene Disc-Elektrophoresen bei Polyacrylamidkonzentrationen von 7,7% bzw. 5,0% (nach Hjerten) in den Gelsystemen pH 7,5 bzw. 8,9 durchgeführt.

TBG-Masse: 60-100 µg

In allen Gelsystemen zeigte sich eine solitäre Bande.

3.2.2. SDS-Elektrophorese

Zum Ausschluß von Verunreinigungen durch Proteine mit anderem Molekulargewicht wurden SDS-Elektrophoresen bei einer Polyacrylamidkonzentration von 7,7% (nach Hjerten) in den Gelsystemen pH 7,5 bzw. 8,9 durchgeführt.

Auch hierbei fanden sich jeweils singuläre Banden.

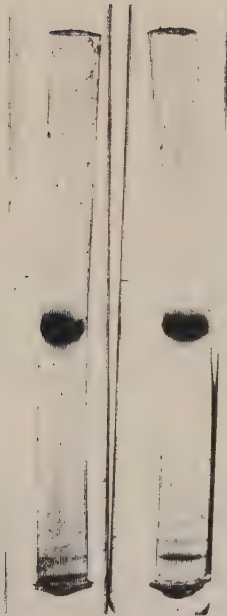


Abb. 5: Auftrennung des präparierten IBG's in Disc- (links) und SDS- Elektrophoresen (rechts) im Puffersystem pH 8,9 bei einer Polyacrylamidkonzentration von 7,7%.

3.2.3 Scatchard Plot

Das molare Bindungsverhältnis von T_4 zu TBG war gemittelt 1:1 (errechnet aus maximaler Bindungskapazität und eingesetzter T_4 -Masse über Scatchard Algorithmus).

T_4

----- - Verhältnis aus 3 Scatchard Plots:

TBG

0,914

0,856

1,279

3,05 : 3 = 1,02

Die gemittelte Assoziationskonstante lag bei

$$K_A = 6,1 \times 10^9 M^{-1}$$

3.2.4. Ultrazentrifugation¹

Zur Ermittlung der hydrodynamischen Eigenschaften von TBG wurden drei Ultrazentrifugationen vorgenommen.

3.2.4.1 Sedimentationsgeschwindigkeitslauf

Im Sedimentationsgeschwindigkeitslauf (56.000 Upm bei 29,9°C) ergab sich ein gleichmäßiger Kurvenverlauf. Damit sind Verunreinigungen durch Fremdsubstanzen ausgeschlossen.

Der Sedimentationskoeffizient errechnet sich zu 3,9 S (umgerechnet auf 20°C und Wasser).

¹ Ich danke Herrn Professor Dr. rer. nat. Helmut KOLB, Städtische Krankenhaus Harlaching, für die Durchführung der Untersuchungen

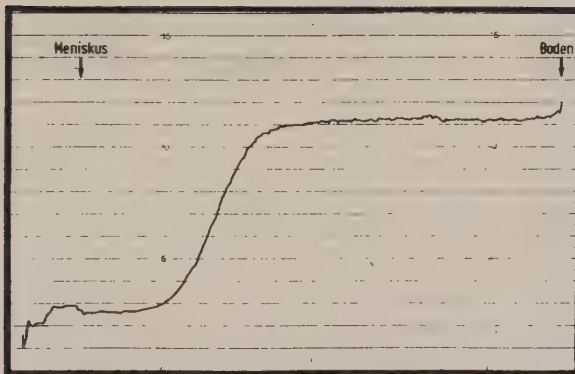


Abb. 6: Scannerbild des Sedimentationsgeschwindigkeitslaufs des
TBG bei 56.000 Upm und 29,9°C.

3.2.4.2. Gleichgewichtslauf

Die einzelnen Punkte der Verteilungskurve liegen auf einer Geraden, was als weiterer Beweis für die Reinheit der Präparation gewertet wird.

Das Molekulargewicht, das sich aus dieser Geraden errechnet, beträgt 60.000 ± 3.000 daltons, das partielle spezifische Volumen ist $0,72 \text{ ml/g}$ und der Diffusionskoeffizient beträgt $5,6 \text{ D}$.

Der Stokes Radius, berechnet aus Molekulargewicht, Sedimentations- und Diffusionskoeffizient ist $37 \text{ \AA}$. Er stellt ein Maß für die Größe des Moleküls dar.

Eine Aussage über die Form des Moleküls erlaubt der Reibungskoeffizient. Mit $1,42$ zählt das TBG zu den globulären Molekülen.

Sedimentation equilibrium run of pure TBG

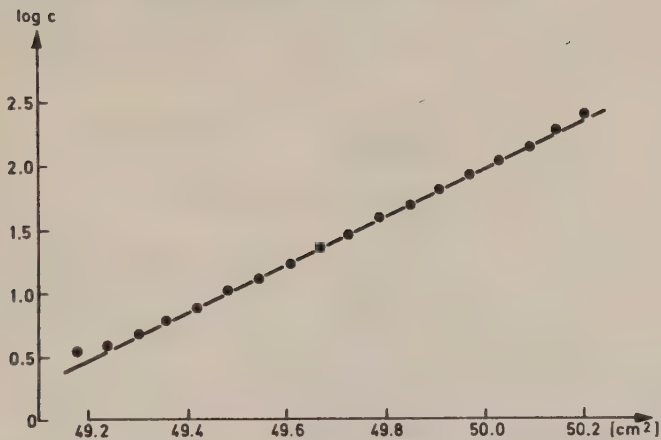


Abb. 7: Gleichgewichtslauf des TBG

Nach 20-stündiger Zentrifugation wurde ein Gleichgewicht erreicht.

Ordinate: lg der TBG-Konzentration
in mm-Schreiberausschlag

Abszisse: Quadrat des Abstandes vom Rotationszentrum
in cm²

3.3. Charakterisierung des TBG

3.3.1. Isoelektrische Fokussierung von präpariertem TBG

3.3.1.1. Verifizierung der Mikroheterogenität

Nach anfänglichen Fokussierungen im Röhrchen wurde die überwiegende Anzahl von Versuchen in der Flachbettechnik durchgeführt, da sich diese Methode hinsichtlich Konstanz der Versuchsbedingung, Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Zeitbedarf der Untersuchung als das bessere Verfahren erwies.

Die TBG-Mikroheterogenität wurde durch Ausschluß möglicher Artefakte verifiziert:

- a) Es wurden mehrere verschiedene TBG-Präparationen in Röhrchen- und in Flachbettechnik untersucht.
- b) Es wurden die gleichen Präparationen in unterschiedlichen Gelzusammensetzungen untersucht: T = 5,3% bzw. 5,0% und C = 3,8% bzw. 3,0% (nach Hjerten); als Katalysator kamen sowohl Riboflavin als auch Ammoniumpersulfat zur Verwendung.
- c) Es wurden die gleichen Proben sowohl im Kathodenbereich als auch im Anodenbereich aufgetragen.
- d) Es wurden verschiedene Nachweisverfahren angewandt: Färbung im Gel durch Bromphenolblau bzw. Coomassie-Brilliant-Blue; Abklatschen mit TBG-Antikörper-haltigen Zellulose-Acetatsstreifen und anschließende Färbung durch Coomassie-Brilliant-Blue (Immunfixation); Aktivitätsmessung des Gels nach Auftrennung von radioaktiv markiertem TBG.
- e) Es wurde durch Immunfixationstechnik nach Flachbett-IEF verglichen zwischen präpariertem TBG und nativem TBG aus frischem bzw. gefrorenem Serum.
- f) Es wurden die einzelnen TBG-Fractionen nach präparativer IEF auf ihre Bindungseigenschaften von T₄ untersucht (s.4.3.2.2.).

Dabei zeigte sich folgendes:

I) Präpariertes TBG zeigte nach sämtlichen IEF-Methoden unabhängig vom verwendeten Nachweisverfahren eine Mikroheterogenität im pH-Bereich 4,1 bis 4,6. Es fanden sich konstant bei pH 4,35, 4,45 und 4,55 drei deutliche und, in Abhängigkeit von der fokussierten TBG-Masse, ein bis drei schwächere Mikroheterogenitätsbanden. Die drei Hauptbanden koinzidierten mit den Aktivitätsspitzen nach IEF von radioaktiv markiertem TBG.

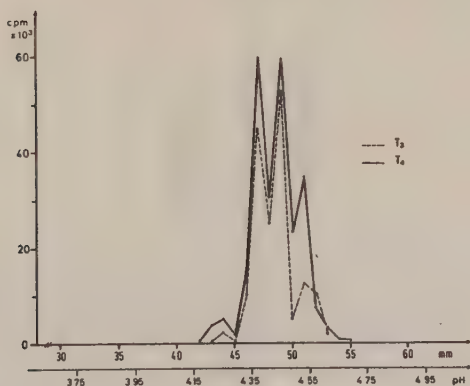


Abb. 8: Röhrchen IEF mit einem pH-Gradienten von pH 3,5 - 5,0.

Oben: Präpariertes TBG wurde fokussiert und im Gel mit Bromphenolblau gefärbt.

Unten: Präpariertes TBG wurde vorinkubiert mit radioaktiv markiertem T₄ bzw. T₃. Nach IEF wurde das Gel in 1mm-Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität gemessen.

II) In den IEF-Untersuchungen von ca. 800 nativen Seren aus der laufenden Laborroutine ergab sich eine exakte Übereinstimmung der Mikroheterogenitätsbanden mit denen von präpariertem IBG, so daß Präparationsartefakte ausgeschlossen sind.

Sowohl Röhren- als auch Flachbettechnik lieferten die gleichen Ergebnisse.

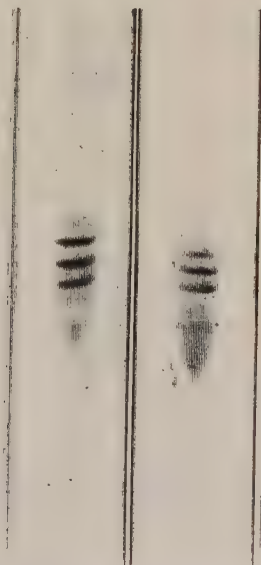


Abb. 9: Röhren IEF von präpariertem IBG, gefärbt im Gel mit Bromphenolblau (links) und Coomassie-Brilliant-Blue (rechts).

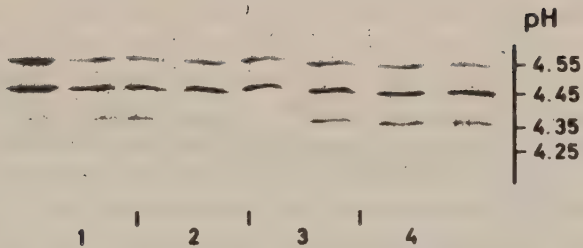


Abb.:10) Flachbett-IEF und anschließende Immunfixation auf TBG-AK-haltigen Zellulose-Acetatstreifen.
Diese wurden mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt.
1 = Präpariertes TBG (gleiche Präparation wie beim Versuch von Abb. 9).
2 - 4 = Natives Serum von gesunden Probanden.

III) Die einzelnen Mikroheterogenitätsfraktionen, gewonnen durch präparative IEF einer größeren Masse präparierten TBG's, enthielten sämtlich Thyroxinbindendes Protein.

3.3.1.2. Veränderung der Mikroheterogenität durch Desialisierung

Zur in vitro-Desialisierung von reinem TBG wurden Neuraminidasepräparationen von Clostridium perfringens (Fa. Boehringer), Vibrio Cholerae (Fa. Behring) sowie Vibrio Cholerae und Influenza Virus (Fa. Calbiochem) verwendet. Dabei erwies sich das qualitative Ergebnis als unabhängig von der verwendeten Enzympräparation, weshalb die meisten Untersuchungen mit der gut handhabbaren Clostridium perfringens-Präparation durchgeführt wurden.

Schon nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten bei einer Enzymkonzentration von 1mU/ml veränderte sich das Mikroheterogenitätsmuster so, daß im angrenzenden alkalischen Bereich neue Banden entstanden. Mit zunehmender Inkubationsdauer (bis 9 Stunden) und ansteigender Enzymkonzentration (bis 100mU/ml) entstanden im alkalischen Bereich neue Banden, während die sauersten Banden verschwanden, so daß gesamthaft das Bild eines in alkalische Richtung wandernden Bandenmusters entstand. Nach drei Stunden Inkubation bei einer Enzymkonzentration von 100mU/ml war ein Zustand erreicht, der sich auch bei fortgesetzter Inkubation (bis 9 Stunden) nicht mehr veränderte. Eine Hauptfraktion lag bei pH 6,0, eine zweite deutliche Fraktion bei pH 5,7 und einige schwache Banden waren bei pH 5,4, 6,2 und 6,3. Die selbst nach 9 Stunden Inkubation erhalten gebliebene Aktivität der Neuraminidase konnte durch Zugabe von frischem TBG bestätigt werden. Kontrollstudien im Inkubationspuffer ohne Enzym bzw. unter Zugabe von Proteasen-Inhibitoren schlossen unspezifische Artefakte aus.

Desialylation of isolated TBG
(*Clostridium perfringens*)

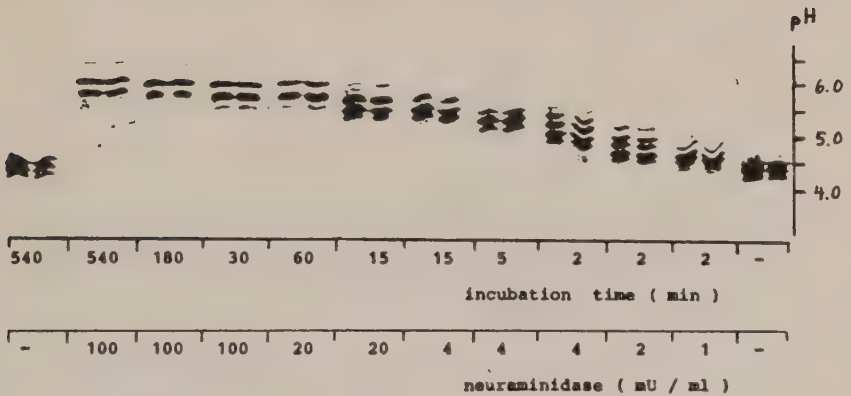


Abb. 11: Schrittweise Desialisierung von reinem TBG.
Präpariertes TBG (500 μ g) wurde mit *Clostridium perfringens*-Neuraminidase in verschiedenen Konzentrationen von 0 - 100mU/ml in Natrium-Acetatpuffer 0,1M pH 5,6 zwei bis 540 Minuten lang inkubiert. Nach Flachbett-IEF (pH-Gradient 3,5 - 10) wurde TBG auf Zellulose-Acetat immunfixiert.

3.3.2. Charakterisierung der einzelnen TBG-Fractionen

Zur Gewinnung der einzelnen Mikroheterogenitätsfraktionen in ausreichender Menge wurde das Verfahren der präparativen IEF (pH-Gradient 4,1 - 4,9) angewandt.

Fokussiert wurden 6 mg präpariertes TBG aus Schwangerenpoolserum. Nach 16-stündiger Fokussierdauer wurden die einzelnen Fraktionen über 5ml-Einmalspritzenzylinder mit geeigneter Fritte aus dem Gel eluiert und zur Messung von pH-Wert, TBG-, T_4 - und NANA-Gehalt gegeben.

Schließlich wurde mittels Äquilibriumsdialyse und Scatchard Plot die Affinitätskonstante zu T_4 bestimmt.

3.3.2.1. pI und relative Verteilung der TBG-Fractionen

Die einzelnen TBG-Fractionen stimmten hinsichtlich ihres pI und, soweit abschätzbar, hinsichtlich ihrer relativen Verteilung auf die einzelnen pH-Bereiche mit nativen Schwangerenserum überein: Es lagen drei Hauptfraktionen bei pH 4,35 , 4,45 und 4,55 , daneben niedriger konzentrierte Fraktionen bei pH 4,15 , 4,25 und 4,65 .

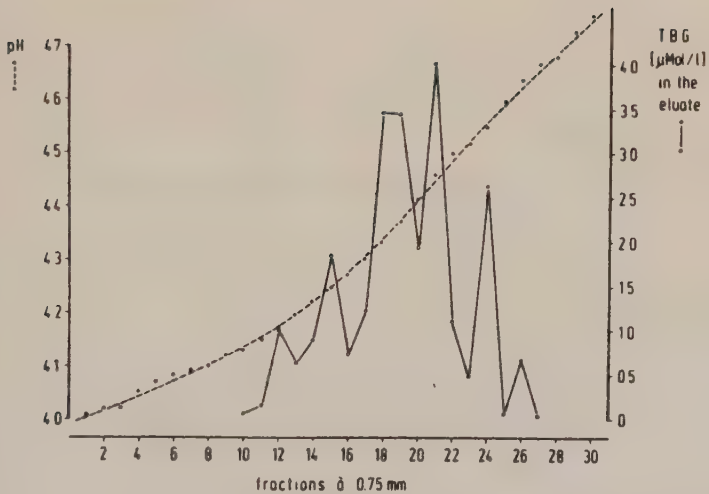


Abb. 12: Präparative Flachbett-IEF (Ultradox^R) von reinem TBG (6mg).

Die TBG-Konzentrationen der einzelnen Fraktionen wurden im TBG-RIA bestimmt, die zugehörigen pH-Werte wurden mit einer pH-Elektrode gemessen.

3.3.2.2. NANA-Gehalt und Assoziationskonstante zu T_4 der TBG-Fractionen

Nach Trennung der einzelnen TBG-Fractionen wurde im Warren-Assay der Gehalt an N-Acetylneuraminsäure bestimmt. Darüberhinaus wurde jede Fraktion einer Äquilibriumdialyse zur Bestimmung der Assoziationskonstante zu T_4 unterzogen.

	pI	NANA/TBG (mol/mol)	K_A ($\times 10^9 M^{-1}$)
Präpariertes TBG		6,5	6,1
fraktioniert in	4,25	10,2	3,1
	4,35	7,2	5,9
	4,45	5,0	7,2
	4,55	4,8	5,0
desialiert	6,2	---	3,3

Tabelle 1: NANA-Gehalte und Affinitätskonstanten zu T_4 der einzelnen TBG-Fractionen im Vergleich zu präpariertem und vollständig desialisiertem TBG.

Aufgrund zu geringer Ausbeute konnte die Fraktion pH 4,15 nicht näher untersucht werden.

Es zeigte sich, daß in den einzelnen TBG-Fractionen mit aufsteigendem pI immer weniger NANA-Moleküle pro TBG-Molekül enthalten sind.

Die Assoziationskonstanten zu T_4 unterschieden sich zwar um den Faktor 2,3, wobei aber die am stärksten vom Mittelwert abweichende Fraktion (pH 4,25; $K_A = 3,1 \times 10^9 M^{-1}$) nur sehr gering konzentriert war. Die drei Hauptfraktionen (pH 4,35, 4,45 und 4,55), die den Hauptanteil des Gesamt-TBG im Serum ausmachen, unterschieden sich hinsichtlich des K_A ($5,0-7,2 \times 10^9 M^{-1}$) so

wenig voneinander, daß eventuelle Verteilungsvariationen für den klinischen Gebrauch des T_4 /TBG-Quotienten ohne Relevanz sind. Ein K_A von $6,1 \times 10^9 M^{-1}$ des Gesamt-TBG ist gut vereinbar mit den Assoziationskonstanten der drei Hauptfraktionen.

In vitro enzymatisch maximal desialisiertes TBG hatte mit einem K_A von $3,3 \times 10^9 M^{-1}$ praktisch die gleiche T_4 -Affinität als die Fraktion bei pH 4,25.

3.4. Untersuchungen nativer Einzelseren

Es wurden ca. 800 native Seren gesunder und kranker Individuen untersucht. Aus Rationalitäts- und Vergleichbarkeitsgründen wurde die Kombination von analytischer Flachbett-IEF und Immunfixation ("Abklatschtechnik" nach Cleve et al (16)) angewandt.

3.4.1. Normales Mikroheterogenitätsbandenmuster

Alle gesunden Probanden zeigten vergleichbare TBG-Mikroheterogenitätsmuster mit demselben pI und der derselben Intensitätsverteilung. Dies galt sowohl im Vergleich der Individualseren untereinander als auch im Vergleich der Individualseren mit präpariertem Pool-TBG.

Viele Erkrankungen einschließlich solcher der Schilddrüse (euthyreote Struma, Hyperthyreose, Hypothyreose) ergaben keine Veränderung des TBG-Mikroheterogenitätsmusters der Seren. Das bedeutet, daß die T_3 -bzw. T_4 -Absättigung des TBG ohne Einfluß auf die TBG-Mikroheterogenität ist.

Die Seren einiger Mitglieder zweier Familien mit bekanntem genetisch bedingtem TBG-Mangel bzw. einer Familie mit bekanntem genetisch bedingtem TBG-Exzeß konnten hinsichtlich ihres Mikroheterogenitätsmusters überprüft werden. Es ergab sich, daß ihre Mikroheterogenitätsmuster sich von den Normalmustern nicht unterschieden.

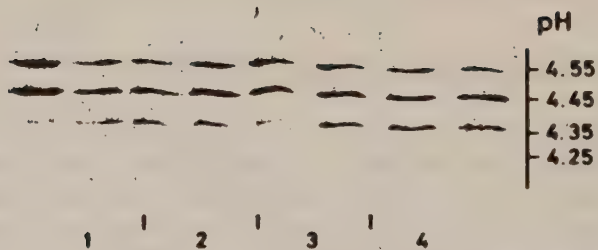


Abb. 13: Immunfixation von TBG nach Flachbett-IEF

pH-Gradient 3,5-5,0),

1 = Euthyreote Struma II°

2 = Hyperthyreose bei dekompensiertem autonomem Adenom

3 = Primäre Hypothyreose bei Z.n. Thyreoiditis

4 = Gesunder Proband

3.4.2. Besondere Mikroheterogenitätsbandenmuster

Bekanntermaßen haben Schwangere bzw. östrogenbehandelte Personen sowie chronisch Leberkranke hohe TBG-Serumkonzentrationen. Bei der vergleichenden Untersuchung dieser beiden Gruppen stellte sich heraus, daß deren Mikroheterogenitätsmuster typische Abweichungen vom Normalmuster aufwiesen.

3.4.2.1. Mikroheterogenitätsmuster von Personen mit erhöhten Östrogenspiegeln

Personen mit erhöhten Östrogenserumkonzentrationen zeigten eine Verschiebung des TBG-Mikroheterogenitätsmusters in den sauren Bereich (Bande bei pH 4,55 abgeschwächt bis verschwunden, Bande bei pH 4,25 intensiviert, Bande bei pH 4,15 neu entstanden). Dies galt sowohl für Schwangere v.a. mit zunehmendem Gestationsalter als auch für Probanden, die aus anderen Gründen erhöhte Östrogenspiegel hatten (Einnahme von Kontrazeptiva, Tumorbehandlung mit Östrogenen).

Bei vier Schwangeren konnten die sequentiellen Veränderungen des TBG-Mikroheterogenitätsmusters beobachtet werden. Dabei zeigte sich, daß sich, ausgehend vom Normalmuster die sauren Banden zunehmend intensivierten, während sich die alkalischen Banden immer mehr abschwächten. Diese Veränderungen waren umso deutlicher, je höher das Gestationsalter war. Bereits eine Woche postpartal waren o.a. Veränderungen nahezu vollständig zum Bild des Normalmusters zurückgebildet.

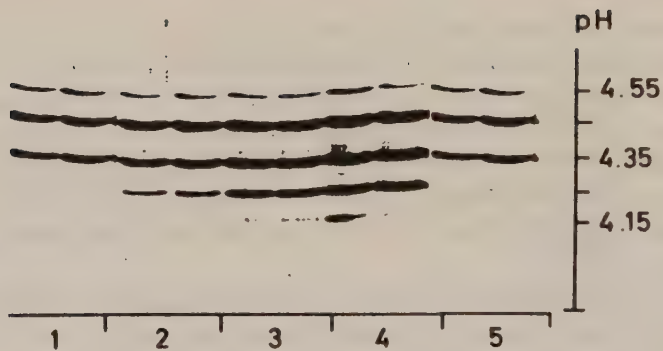


Abb. 14: Immunfixation von TBG nach Flachbett-IEF
(pH-Gradient 3,5-5,0).

TBG-Mikroheterogenitätsmuster zu verschiedenen
Zeitpunkten der Schwangerschaft eines Individuums.

1 = 4. SS-woche sowie eine Woche postpartal

2 = 16. SS-woche

3 = 28. SS-woche

4 = 35. SS-woche

5 = 1 Woche postpartal

3.4.2.2. Mikroheterogenitätsmuster von chronisch Leberkranken

Die Untersuchung dieser Personengruppe (verschiedene Cirrhosen, Hepatitiden, Lebertumoren und -metastasen zeigte, daß die TBG-Serumkonzentrationserhöhungen hier von ganz anderer Qualität als bei der Östrogengruppe sind. Hier war das Mikroheterogenitätsmuster schwerpunktmäßig in den alkalischen Bereich verschoben (Bande bei pH 4,55 intensiviert, Bande bei pH 4,25 abgeschwächt, Bande bei pH 4,15 nicht vorhanden).

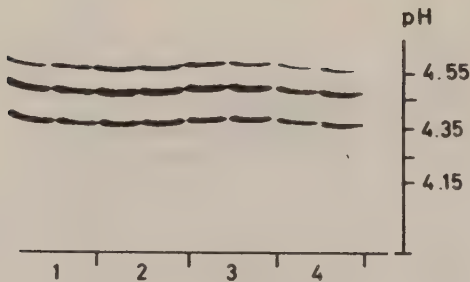


Abb. 15: Immunfixation von TBG nach Flachbett-IEF
(pH-Gradient 3,5-5.0).

- 1 = Laennec'sche Lebercirrhose
- 2 = Hepatitis B (chronisch persistierend)
- 3 = Primärer Leberzelltumor
- 4 = Normalmuster

3.4.2.3. Mikroheterogenitätssondermuster von unreifen Frühgeborenen

Im Gegensatz zu den TBG-Bandenmustern reifer Neugeborener, welche sich vom Normalmuster nicht unterschieden, waren die Muster von vier untersuchten unreifen Frühgeborenen untereinander zwar ähnlich, vom Normalmuster aber völlig abweichend. Neben den Normalbanden zeigten sich dicht angelagert zusätzliche Banden, womit Doppelbanden entstanden sind. Ein Frühgeborenes konnte sechs Monate später nachuntersucht werden; es stellte sich heraus, daß sich sein TBG-Mikroheterogenitätsmuster völlig normalisiert hatte.

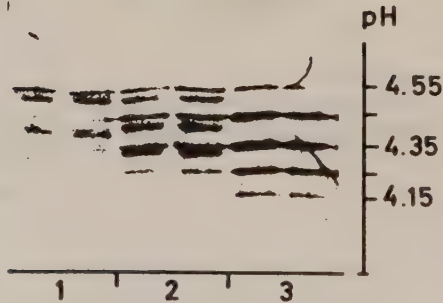


Abb. 16: Immunfixation von TBG nach Flachbett-IEF
(pH-Gradient 3,5-5,0).

- 1 = Unreifes Frühgeborenes, 30. SS-woche, 5 Tage alt
- 2 = Unreifes Frühgeborenes, 31. SS-woche, 5 Tage alt
- 3 = Frühgeborenes Nr 2, nachuntersucht nach sechs Monaten

3.4.3. Zusammenfassende Darstellung der Mikroheterogenitätsmuster

Da während einer Analyse ca. 25 Proben unter gleichen Bedingungen untersucht werden konnten, war es sinnvoll, die Intensität der Mikroheterogenitätsbanden densitometrisch zu messen. Die zugehörigen Densitogramme verdeutlichen die Charakteristika der typischen Bandenmuster.

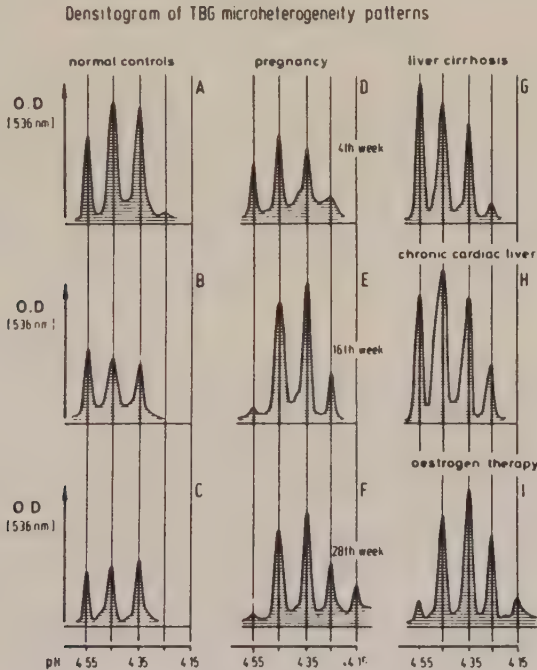


Abb. 17: Vergleich der Densitogramme
(O.D. = optische Dichte = 536nm) einiger typischer
TBG-Mikroheterogenitätsmuster nach Flachbett-IEF
(pH-Gradient 3,5-5,0) und Immunfixation.

4. Diskussion

4.1. Präparation

Seitdem Ende der fünfziger Jahre die Bedeutung des TBG klar wurde (84), wurden zahlreiche Versuche unternommen, TBG zu isolieren, was sich aber aufgrund niedriger Serumkonzentration und relativer Instabilität den damaligen Methoden gegenüber als sehr schwierig erwies. Durchgreifende Fortschritte konnten erst erzielt werden, nachdem Pensky und Marshall 1969 die affinitätschromatographische Technik in den Präparationsprozeß einführten.

Da im allgemeinen die Interaktionen zwischen Antikörpern und ihren Antigenen bzw. Transportproteinen und deren Liganden durch sehr hohe Assoziationskonstanten gekennzeichnet sind, eignen sich diese Komponenten besonders zur Affinitätschromatographie.

Schließlich erwies es sich als am effektivsten, I_4 oder I_3 über Spacergruppen an eine Trägermatrix fixieren (11,55,76). Diese natürlichen Thyronine binden die TBG-Moleküle mit hoher Affinität.

Trotz allem gelang es lange Zeit nicht, auf weitere differente chromatographische Reinigungsschritte wie Ionenaustauschchromatographie zu verzichten.

Wir konnten eine Präparationsmethode entwickeln, welche aus nur noch zwei affinitätschromatographischen Schritten bestand: Das TBG, welches über I_3 fest an die stationäre Phase gekoppelt war, wurde mit geeigneten Spüllösungen von den übrigen Serumproteinen hoch gereinigt.

Nach Elution enthielt das TBG außer Salz nur noch gereinigtes Humanalbumin als Lösungsvermittler für I_4 , welches zur Desorption des TBG benötigt wurde. Die Beseitigung des künstlich eingeführten Albumins gelang problemlos über Concanavalin A - Affinitätschromatographie.

Dieses Verfahren erlaubte schließlich, daß TBG schnell und schonend in nennenswerten Mengen isoliert werden konnte, was wiederum eine Voraussetzung für die weitere Untersuchung der TBG-Mikroheterogenität war. Die Gesamtausbeute stieg von 20 - 25% mit früheren Verfahren (11,31,45,47,55,71,117) über 50% (14) bis

60% mit der hier beschriebenen Präparationstechnik. Die Ursache hierfür liegt darin, daß die verwendete I_3 -Epoxy-Sepharose TBG mit so hoher Affinität bindet, daß nach mehreren Spülschritten in der spezifischen Elution mit I_4 , in Albumin-Lösung gelöst, lediglich I_4 -TBG und Albumin eluiert wurden.

Bereits frühere Messungen hatten gezeigt, daß die TBG-Konzentration vergleichbar der Konzentrationsänderung anderer Glykoproteine (92) im Verlauf der Schwangerschaft zuerst drastisch und schließlich nur noch mäßig zunimmt. Serum aus den letzten Schwangerschaftswochen, das wir bevorzugt zu erhalten suchten, weist einen durchschnittlichen TBG-Spiegel von 4,5mg/dl auf. Aus Gründen, die nicht näherer Ausführung bedürfen, ist es jedoch nicht möglich, homologes Serum aus dieser Graviditätsperiode in größeren Mengen zu erhalten, so daß die Untersuchungen mit Poolserum durchgeführt wurden. Daraus ergibt sich natürlich das Problem, daß in einem Präparationsgang TBG von einer Vielzahl von Individuen enthalten ist (s.u.5.2.).

4.2. Mikroheterogenität

Marshall et al (62) konnten 1973 erstmals zeigen, daß reines TBG ähnlich anderen Glykoproteinen in der isoelektrischen Fokussierung (Röhrchenmethode) eine Mikroheterogenität aufweist. Schon damals konnte eine Kontamination mit anderen Proteinen (durch immunologische, verschiedene elektrophoretische und Ultrazentrifugationsuntersuchungen) oder ein Zerfall des TBG in verschiedene Untereinheiten (durch Bindungsstudien mit I_4) als mögliche Ursachen einer eventuellen Pseudo-Mikroheterogenität ausgeschlossen werden.

Auch Gärtner und Mitarbeiter (29) konnten mittels autoradiographischer Untersuchungen zeigen, daß sämtliche Mikroheterogenitätsbanden und ausschließlich diese radioaktiv markiert waren, wenn TBG vor Fokussierung mit radioaktiv markiertem I_3 bzw. I_4 inkubiert worden war.

In der vorliegenden Arbeit wurden zum weiteren Ausschluß irgendwelcher Artefakte, die im Verfahren der IEF selbst begründet sein könnten, zwei verschiedene Katalysatoren zur Polymerisation der Acrylamide (Riboflavin bzw. Ammoniumpersulfat), verschiedene kommerziell erhältliche Ampholine-Präparationen (Fa. LKB bzw. Fa. Pharmacia), unterschiedliche pH-Bereiche, unterschiedliche Arten der Probenapplikation (anodal bzw. kathodal) sowie verschiedene Gelkonzentrationen angewandt. In allen beschriebenen Fällen ergaben sich identische Mikroheterogenitätsmuster. Dies steht allerdings im Widerspruch zu den Daten von Marshall et al (62), die in Abhängigkeit vom verwendeten Katalysator vier (bei Ammoniumpersulfat) bzw. neun (bei Riboflavin) Mikroheterogenitätsbanden im pH-Bereich 4,2 - 5,2 fanden. Eine mögliche Erklärung wird in der Tatsache gesehen, daß in vorliegender Arbeit der Polymerisationskatalysator in einem kurzen Vorlauf aus dem Gel entfernt wurde, bevor die Proben aufgetragen wurden.

Da bei den üblichen Präparationen Poolserum verwendet wird und damit IBG von vielen Individuen enthalten ist, besteht die Möglichkeit, daß genetisch unterschiedliche IBG-Konfigurationen eine Mikroheterogenität nur vortäuschen (Pseudo-Mikroheterogenität). Zum Ausschluß dieses Phänomens wurden ca. 800 Einzelseren mit einer Kombination von Flachbettgel-IEF und Immunfixation untersucht (s. 5.4.). Dabei waren zwischen den Mikroheterogenitätsmustern von präpariertem IBG einerseits und den individuellen Seren andererseits keine qualitativen Unterschiede feststellbar.

Marshall hatte 1973 zwar eine Diskrepanz gesehen zwischen den Mustern von Poolseren und einem einzelnen Spender; er macht aber keine Angaben über eventuelle Lebererkrankungen bzw. erhöhte Östrogenkonzentrationen im Serum dieses Probanden (s. 5.4.). Da die Einzelseren keinerlei Präparationsprozedur unterzogen wurden, stellt die oben erwähnte Identität der Mikroheterogenitätsmuster auch einen wichtigen Globalbeweis zum Ausschluß von systemimmanenten Präparationsartefakten dar.

4.3. Desialisierung

4.3.1. Desialisierung und Mikroheterogenitätsveränderungen

Gelegentlich wurde in verschiedenen Labors bei der Untersuchung von präpariertem Pool-TBG eine vierte Proteinfraction gefunden, die in der Elektrophorese kathodenseitig dicht neben den drei üblichen Banden (TBG, Albumin, Präalbumin) lag. Da dieses Protein nur inkonstant auftrat, glaubte man anfänglich noch an Artefakte durch Gefrieren oder Lagerung bzw. durch TBG-Albumin-Komplexe (3,4), bis 1970 Premachandra und Mitarbeiter erstmals postulierten, daß dieses "slow TBG" (STBG) unterschiedlich desialisiertes TBG sei (79). Es hatte sich gezeigt, daß dieses STBG vornehmlich im Serum von schwer leberkranken Personen gefunden wurde (97) und durchaus in der Lage war, radioaktiv markiertes Thyroxin zu binden (autoradiographisch) (5,61). Nachdem andere Glykoproteine, die desialisiert worden waren, ähnliche elektrophoretische Veränderungen zeigten (91), lag es nahe, Auswirkungen einer NANA-Abspaltung von TBG zu untersuchen.

Schonende enzymatische Desialisierungen von isoliertem TBG, das den üblichen Reinheitskriterien genügte, führten in Abhängigkeit von der Dauer der Enzymeinwirkung zu einer Veränderung und Verlagerung des Mikroheterogenitätsbandenmusters in alkalischere pH-Bereiche. Der erreichbare Endzustand, der sich selbst unter schärfsten Desialisierungsbedingungen nicht mehr veränderte, bestand in einem Mikroheterogenitätsmuster bestehend aus einer Hauptbande bei pH 6,0 und diversen schwachen Banden in angrenzenden pH-Bereichen. Zum Ausschluß von allfälligen Artefakten, die enzymunabhängig entstanden sein könnten, wurden Kontroll-experimente in einfachem Puffer (ohne Neuraminidase) bzw. unter Zusatz von Proteasen-Inhibitoren (Aprotinin-Trasylol) durchgeführt. Eine singuläre Bande, wie theoretisch erwartet, wurde allerdings nie erreicht. Mögliche Erklärungen sind darin zu suchen, daß das verbleibende TBG-Molekül instabil wird (zB. durch Verlust von Kohlenhydratseitenketten), bei langer Inkubation eine bakterielle Zersetzung stattfindet oder einige TBG-Moleküle Neuraminsäuren so enthalten, daß sie nicht mit den verfügbaren

Neuraminidasen abgespalten werden können. Dies wären Neuraminylreste, die entweder mehrfach acetyliert sind oder weder über eine 2→3 noch eine 2→6, sondern eine 2→4 Funktion an den Galaktosylrest gekoppelt sind (53) (s.3.2.5.2.1.). In Analogie dazu war auch die Arbeitsgruppe um Zinn (118) nicht in der Lage, mehr als 85% der gebundenen Neuraminsäuren abzulösen. Die Möglichkeit der unterschiedlichen Verknüpfung der verbleibenden Kohlenhydrate in den vier Seitenketten (118), wie es für andere Glykoproteine, die in mehreren Organen synthetisiert werden, beschrieben ist (53), scheidet für IBG aus, da es ausschließlich hepatogen ist (35). Marshall et al (62) konnten in ähnlichen Desialisierungstudien zwar eine Verschiebung des Mikroheterogenitätsmusters in alkalischere Bereiche, aber keine Veränderung der Banden hinsichtlich Anzahl und Intensität feststellen. Er nahm damals (1973) an, daß die Mikroheterogenität des IBG durch unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung bedingt sei. Möglicherweise hatte er das Glykoprotein nur unzureichend desialisiert, denn auch nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit findet zuerst ein Bandenshift in alkalische Richtung und dann erst eine Reduktion der Bandenzahl statt.

Cheng und Mitarbeiter (14) konnten 1979 zeigen, daß IBG-Moleküle, deren Zuckeranteil zu 86% enzymatisch entfernt worden war, sich hinsichtlich ihrer Primär- und Sekundärstruktur stabil verhielten und allenfalls geringe Veränderungen der Tertiärstruktur zeigten, von denen die Thyroxin-Bindungsfähigkeit, die Antigenität und die Hitzestabilität nicht beeinflußt wurden. Diese Veränderungen der Tertiärstruktur könnten verantwortlich sein für die schwachen Nebenbanden in der IEF nach Desialisierung.

Die Tatsache der Mikroheterogenitätsveränderung durch Einwirken von Neuraminidasen verstärkte die Annahme des ursächlichen Zusammenhang zwischen IBG-Mikroheterogenität und unterschiedlichem NANA-Gehalt der IBG-Moleküle.

4.3.2. Desialisierung und NANA-Gehalt

Nachdem mittels präparativer IEF isoliertes TBG in seine vier Hauptfraktionen separiert worden war, konnte obige Annahme verifiziert werden, indem die Fraktionen mit steigendem pI immer weniger NANA-Moleküle pro TBG-Molekül enthielten (10 - 4mol NANA pro mol TBG). Auch diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß einzelne Neuraminylreste über eine 2→4 Funktion am Galaktosylrest gebunden sind, eine Bindung, die von den zur Verfügung stehenden Neuraminidasen nicht gelöst werden konnte. Der durchschnittliche NANA-Gehalt von präpariertem und nicht in Einzel- fraktionen separiertem TBG beträgt 6,0 - 6,5mol NANA pro mol TBG, was hinsichtlich der Ergebnisse der Einzelfraktionen voll plausibel ist.

Die Literaturangaben über den NANA-Gehalt von TBG variieren von 0 -10mol NANA pro mol TBG (31,118), wobei zu bedenken ist, daß die N-Acetylneuraminsäure ein sehr empfindliches Kohlenhydrat ist, der Warren-Assay (107) zur Messung ihrer Konzentration in seiner technischen Handhabung nicht ganz unproblematisch ist und schließlich unterschiedliche Spenderkollektive und unterschiedliche TBG-Präparationsverfahren divergierende Ergebnisse bedingen können.

4.3.3. Desialisierung und I_4 -TBG Affinität

Mittels Äquilibriumsdialyse und Algorithmus nach Scatchard (88) wurde das Bindungsverhalten von TBG zu I_4 untersucht. Von der sauersten Fraktion (pI = 4,25) abgesehen (methodischer Fehler bei Einmalbestimmung wegen zu geringer Masse? Beginnende chemische Instabilität des TBG?) unterschieden sich die einzelnen TBG-Fraktionen größenordnungsmäßig nicht voneinander. Ihre Affinitäten zu I_4 stimmten mit der des nicht separierten Gesamt-TBG überein ($K_A \sim 6 \times 10^9 M^{-1}$). Das enzymatisch maximal desialisierte TBG wies eine I_4 -Affinität auf, die nur ungefähr halb so groß wie diejenige des unbehandelten TBG war ($K_A \sim 3 \times 10^9 M^{-1}$). Diese Ergebnisse stimmen sowohl hinsichtlich der absoluten Werte ($K_A = 1,6 \times 10^9 - 2,2 \times 10^{10} M^{-1}$) (13,14,26,40,41,56,61,71,74,83,

101,114) als auch hinsichtlich der Veränderung durch enzymatische Desialisierung ($K_A(\text{DTBG}) = 0,3 \times K_A(\text{TBG})$ (14), $K_A(\text{DTBG}) = 0,1 \times K_A(\text{TBG})$ (61,83)) mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen überein.

In Übereinstimmung mit Fluoreszenzuntersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen (32) ergab sich nach Scatchard-Algorithmus ein gemittelt molares Bindungsverhältnis $T_4:\text{TBG}$ von 1:1.

4.4. Untersuchungen nativer Einzelseren

Nachdem gezeigt war, daß ein unterschiedlicher Gehalt von NANA hinter dem elektrophoretischen Phänomen der TBG-Mikroheterogenität steckt, war zu klären, ob jedes einzelne Individuum TBG mit unterschiedlichem NANA-Gehalt und damit eine TBG-Mikroheterogenität hat oder ob letzteres nur ein Summations- und Überlagerungsergebnis ist, entstanden beim Pooling von Einzelseren mit unterschiedlich NANA-enthaltendem TBG. Ist die TBG-Mikroheterogenität ein inter- oder intraindividuelles Phänomen?

Mit der sehr rationellen und eine gute Vergleichbarkeit gewährleistenden Kombination aus analytischer Flachbettgel-IEF und anschließender Immunfixation ("Abklatschtechnik" nach Cleve (16)) konnten ca. 800 Individualseren ohne irgendwelche Präparationsvorgänge, also nativ hinsichtlich ihrer TBG-Mikroheterogenität untersucht werden.

Dabei zeigte sich, daß sowohl gesunde, als auch an verschiedenen Organsystemen einschließlich der Schilddrüse erkrankte Probanden Mikroheterogenitätsmuster aufwiesen, welche sowohl untereinander als auch dem Muster von präpariertem Pool-TBG gegenüber vergleichbar waren. Die Mikroheterogenitätsmuster einiger Mitglieder zweier Familien mit bekanntem genetisch determiniertem TBG-Mangel bzw. einer Familie mit bekanntem genetisch bedingtem TBG-Exzess waren vom Normalmuster nicht zu unterscheiden (75).

Es schälten sich jedoch zwei Gruppen heraus, welche beide erhöhte TBG-Serumkonzentrationen aufwiesen, welche nicht genetisch bedingt waren:

Eine Gruppe bestehend aus Personen mit erhöhten Östrogenserumspiegeln (Schwangere, östrogenbehandelte Mamma- und Prostatacarcinom-Patienten) hatte ein Mikroheterogenitätsmuster mit Intensivierung der Banden im sauren Bereich. Bei einigen Schwangeren konnte in Verlaufsuntersuchungen gezeigt werden, daß das Mikroheterogenitätsmuster ausgehend vom Normalen mit fortschreitendem Gestationsalter zunehmend sauer betont war, um einige Tage postpartal sich zum Normalmuster zurückzuverwandeln.

Die zweite Gruppe wurde von dekompensierenden Lebererkrankungen (Lebercirrhose, primär biliäre Cirrhose, Hepatitis, primärer Leberzelltumor, Metastasenleber) mit erhöhtem TBG-Spiegel gebildet. Ihr Mikroheterogenitätsmuster war hinsichtlich ihres Schwerpunkts in den alkalischeren Bereich verschoben. Dies ist die Gruppe von Individuen, die teilweise desialisiertes TBG (anfänglich als STBG = slow-TBG bezeichnet) in nachweisbaren Mengen im Serum enthält. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Marshall et al, der 1974 zeigen konnte, daß STBG im Serum von bestimmten Leberkranken wirklich vorkommt (63).

Da in vielen Labors zur Beurteilung der Schilddrüsenstoffwechselsituation der Quotient T_4/TBG bestimmt wird, ist es von großer klinischer Wichtigkeit, daß die normalerweise vorkommenden TBG-Arten sich hinsichtlich ihrer Affinität zu T_4 und damit ihrer Stoffwechselbeeinflussung nicht wesentlich unterscheiden (78) (s.o.).

4.5. Bedeutung der endständigen NANA für den Glykoproteinstoffwechsel

Nachdem Mori 1969 einen extremen Wirkungsverlust von gonadotropen Hormonen nach Abspaltung von NANA gesehen (68) und Morell 1968 das Phänomen der raschen Kreislaufelimination von desialisiertem Ceruloplasmin beschrieben hatte (66), lag es nahe, daß dieses fast immer endständige Zuckermolekül eine wichtige Funktion für das Gesamtglykoprotein hat. Die Arbeitsgruppe von Morell veröffentlichte 1971 Untersuchungsergebnisse, wonach dieser offensichtliche Regulationsmechanismus für den Abbau von Glykoproteinen für Orosomucoid, Fetuin, Ceruloplasmin, Haptoglobulin,

α_2 -Makroglobulin, Thyreoglobulin, Laktoferrin, humanes Choriongonadotropin (HCG) und Follikelstimulierendes Hormon (FSH), aber nicht für Transferrin gilt (67). Ebenso konnte gezeigt werden, daß sich die aus dem Kreislauf eliminierten Glykoproteine in den Hepatozyten, nicht aber in den Kupffer'schen Sternzellen wiederfinden (67,104). 1972 gelang es Van Lenten (105) und Ashwell (2) zu zeigen, daß die Plasmamembranfraktion von Rattenleberzellen spezifische Bindungsstellen mit Sättigungskinetik für Desialo-Glykoproteine haben (105). 1976 sprach die gleiche Arbeitsgruppe (Kawasaki, Ashwell) von einem unspezifischen Desialo-Rezeptor an der Hepatozytenmembran, dessen Bindungsstelle eine membrangebundene Galaktosyltransferase sei (49,111).

1974 konnte Marshall et al (63) zeigen, daß auch desialisiertes TBG sehr rasch in die Rattenleber aufgenommen wird und im Ashwell-Assay (2) mit anderen Desialo-Glykoproteinen um Bindungsstellen konkurriert. Gleichzeitig fand er, daß dieses DTBG bei bestimmten Lebererkrankungen im menschlichen Serum wirklich nachweisbar ist. Damit war auch TBG in die immer länger werdende Reihe von Glykoproteinen aufgenommen, deren Kreislaufelimination durch NANA gesteuert schien (Prothrombin 1971 (69), Erythropoietin 1974 (8), Corticosteroidbindendes Globulin (CBG) 1974 (103), Carcinoembryonales Antigen (CEA) 1975 (102), Interferon 1977 (7), Faktor VIII 1977 (96), γ -Glutamyltransferase (γ -GT) 1979 (52)).

Nachdem 1976 bzw. 1977 die Arbeitsgruppe um Gershengorn und Glinioer nach in vivo- und in vitro-Untersuchungen weitere Erkenntnisse über den TBG-Stoffwechsel mitgeteilt hatten (hoher Östrogenspiegel bewirkt hohe Syntheserate des TBG (30,36,37)), stellt sich aus heutiger Sicht die Steuerung des Glykoprotein-stoffwechsels in Form eines biologischen Funktionskreislaufs folgendermaßen dar (6,50,52,53,54):

Nach Synthese der Proteinkette im rauen endoplasmatischen Retikulum werden durch spezifische Glykosyltransferasen im glatten endoplasmatischen Retikulum die verschiedenen Zuckerreste angeheftet (meist Galaktose, Mannose, N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin, Fucose, N-Acetylneuraminsäure). NANA und Fucose sind grundsätzlich terminal, Galaktose häufig präterminal

lokalisiert. Die Anzahl der Kohlenhydrate pro Gesamtmolekül schwankt ganz erheblich (1 bis ca. 800). Durch Anheftung terminaler NANA-Moleküle werden Glykoproteine erst sekretionsfähig und gleichzeitig vor sofortiger Reabsorption geschützt (42). Im weiteren zeitlichen Verlauf werden terminale NANA durch Neuraminidasen im Blutplasma (nachgewiesen in Brustdrüse, Leber, Niere, Gehirn, Darmschleimhaut, Milz, Knochenmark, Leukozyten, Hoden (6)) abgespalten. Die präterminale Galaktose wird zum reaktiven Zuckerrest, es erfolgt, nicht zuletzt als Schutz vor der Bildung von Autoantikörpern (6), die Bindung an den galaktosespezifischen Rezeptor der Leberzellmembran (6,46,49) und die rasche Endozytose des als gealtert erkannten Glykoproteins (2,6,27,83,96,99,102,104). Durch unterschiedliche Art und Anzahl der Bindung von NANA-Molekülen an Glykoproteine wird damit schon bei der Synthese das Alterungsprogramm des Proteins festgelegt. Inzwischen konnte für eine Vielzahl von Glykoproteinen des Plasmas dieses Prinzip eines Zuckersequenz-abhängigen turnovers bestätigt werden (6).

Fast alle Glykoproteine zeichnen sich ferner durch eine Mikroheterogenität aus. Hierunter versteht man eine unvollständige oder vollständige, jedoch variierte Zuckersequenz. Während diese Mikroheterogenität bisher als zufälliges Ereignis oder Ergebnis der Einwirkung von Glykosidasen gedeutet wird, bestehen seit kurzem auch Hinweise auf eine reifungsabhängige Mikroheterogenität (6, 53). Typisch für fetale und in Regeneration befindliche Gewebe (Modellorgan: Zustand nach Teilhepatektomie (51,94)) ist der vermehrte Anteil endständiger NANA am Kohlenhydratrest von Glykoproteinen. Wahrscheinlich existieren auch reifungsabhängige Isoenzyme der Sialyltransferase (95). Damit erklären sich die Doppelbanden-Mikroheterogenitätsmuster von vier unreifen Frühgeborenen, die im Rahmen der Untersuchung von 800 Einzelseren in dieser Arbeit gefunden wurden. Die Doppelbanden repräsentieren wahrscheinlich eine für die reife Leber untypische Verknüpfung von NANA am Kohlenhydratrest. Der transiente Charakter dieser Erscheinung wird belegt durch den Befund eines völlig normalen TBG-Mikroheterogenitätsmusters eines dieser Frühgeborenen anlässlich einer Untersuchung, die ein halbes Jahr später stattfand.

Hypothetic causes of microheterogeneity pattern of TBG

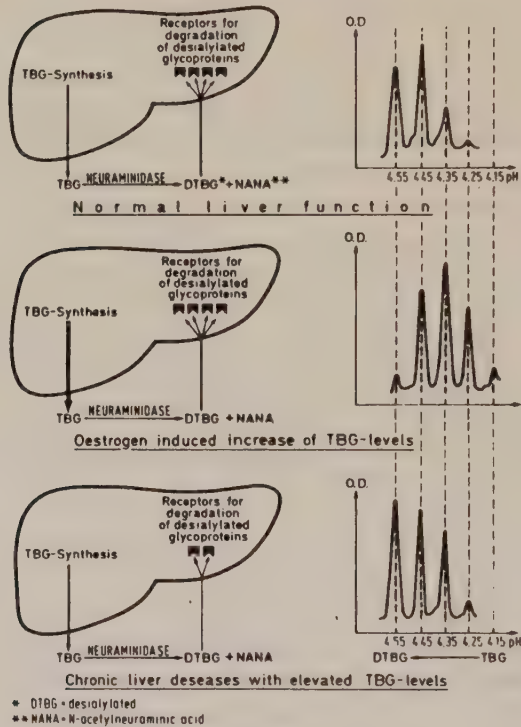


Abb. 18: Zusammenfassende Darstellung des TBG-Kreislaufs von der Synthese bis zum Abbau im Normalfall sowie in den Sonderfällen Östrogenspiegelerhöhung bzw. chronische Lebererkrankung.

Densitometrische Darstellung der zugehörigen Mikroheterogenitätsmuster, wie sie nach isoelektrischer Fokussierung typischerweise gefunden werden.

5. Zusammenfassung

Es wurde ein schonendes Präparationsverfahren von Thyroxinbindendem Globulin (TBG) aus menschlichem Serum erarbeitet, welches aus zwei affinitätschromatographischen Schritten auf einer I_3 -Epoxy-Sepharose und einer Con A-Sepharose bestand. Reinheitskriterien der Proteinpräparation waren eine einzige Bande in mehreren überladenen Disc- und SDS-Elektrophoresen mit unterschiedlichen Polyacrylamidgelkonzentrationen, sowie eine äquimolare Bindung von T_4 . Das Molekulargewicht wurde mit 60.000 ± 3.000 daltons bestimmt, was mit Literaturangaben gut übereinstimmt. Nach isoelektrischer Fokussierung (IEF) zeigte reines TBG im pH-Bereich 4,1-4,6 drei Hauptfraktionen bei pH 4,35; 4,45; 4,55; sowie in Abhängigkeit von der fokussierten TBG-Masse ein bis drei schwächere Banden. Nach Trennung der Hauptanteile durch präparative IEF konnte ihr Gehalt an N-Acetylneuraminsäure (NANA) bestimmt werden. Dieser stieg kontinuierlich mit fallendem pI (pI = 4,55: 4,8 mol NANA/mol TBG; pI = 4,45: 5,0 mol NANA/mol TBG; pI = 4,35: 7,2 mol NANA/mol TBG)

Die Unterschiede der einzelnen TBG-Fraktionen hinsichtlich ihrer Assoziationskonstante K_A zu T_4 waren nicht bedeutend und bewegten sich im Bereich von $3,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ bis $7,2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

Schrittweise Desialisierung von reinem TBG in vitro führte zu einer fortschreitenden Verlagerung des sich ändernden Bandenmusters in alkalischere Bereiche mit einer Hauptfraktion bei pH 6,0.

Einige klinische Zustände gehen mit Veränderungen der typischen Zusammensetzung des Gesamt-TBG aus den einzelnen TBG-Fraktionen einher. Personen mit chronischen Lebererkrankungen weisen eine Betonung der alkalischeren Fraktionen wohl als Zeichen des verminderten TBG-Abbaus auf, Personen mit erhöhten Östrogenspiegeln haben eine Betonung der sauren Fraktionen wohl als Zeichen der forcierten Synthese von TBG.

Die Reihenuntersuchung von ca. 800 Nativseren aus der täglichen Routine lieferte keinerlei Anhalt für die Existenz von TBG mit abweichender Aminosäurezusammensetzung. Da die Affinitäten der einzelnen TBG-Fraktionen zu T_4 einander so ähnlich sind, sind

diese unterschiedlichen Zusammensetzungen des TBG in verschiedenen klinischen Zuständen (v.a. Lebererkrankungen bzw. erhöhte Östrogenspiegel) bei der Beurteilung des gebräuchlichen T_4 -TBG-Quotienten ohne Bedeutung.

Es bestehen deutliche Hinweise darauf, daß das TBG nach seiner Synthese in der Leberzelle vollständig sialisiert in den Kreislauf abgegeben wird, im Lauf der Zirkulationsphase durch Einwirkung ubiquitär vorkommender Neuraminidasen in seinem NANA-Gehalt verändert wird und dadurch schließlich von Leberzellrezeptoren als gealtert erkannt und in die Leberzelle zum Abbau aufgenommen wird. Die Mikroheterogenität des TBG ist damit nichts anderes als das zeitliche Querschnittsbild eines Proteins, welches im Lauf seines Lebens das biochemische Aussehen verändert.

6. Literaturverzeichnis

1. ADA, G.L., FRENCH, E.L., LIND, P.E.
Purification and properties of neuraminidase from
Vibrio Cholerae.
J.Gen.Microbiol. 24, 409 (1961)
2. ASHWELL, G., MORELL, A.G.
The role of surface carbohydrates in the hepatic
recognition of circulating glycoproteins.
Adv. Enzymol. 41, 99 (1974)
3. BLUMBERG, B.S., ROBBINS, J.
Thyroxine-serum protein complexes: Single dimension
gel and paper electrophoresis studies.
Endocrinology 67, 368 (1960)
4. BLUMBERG, B.S., FARER, L., RALL, J.E., ROBBINS, J.
Thyroxine-serum complexes: Two dimension gel and
paper electrophoresis studies.
Endocrinology, 68, 25 (1961)
5. BLUMBERG, B.S., WARREN, L.
The effect of sialidase on transferrins and other
serum proteins.
Biochim. Biophys.Acta 50, 90 (1961)
6. BOCCI, V.
The role of siliac acid in determing the life-
span of circulating cells and glycoproteins.
Experientia 32, 135 (1976)
7. BOSE, S., HICKMAN, J.
Role of the carbohydrate moiety in determing the
survival of interferon in the circulation.
J. Biol.Chem. 252, 8336 (1977)
8. BRIGGS, O.W., FISHER, J.W., GEORGE, W.J.
Hepatic clearance of intact and desialylated
erythropoietin.
Am. J. Physiol. 227, 1385 (1974)
9. CASSIDY, J.T., JOURDIAN, G.W., ROSEMAN, S.
Purification and properties of sialidase from
Clostridium perfringens.
J. Biol.Chem. 240, 3501 (1965)
10. CASSIDY, J.T., JOURDIAN, G.W., ROSEMAN, S.
Sialidase from *Clostridium perfringens*.
Methods Enzymol 8, 680 (1966)

11. CAVALIERI, R.R., MC MAHON, F.A., CASTLE, J.N.
Preparation of ^{125}I -labelled human thyroxine-binding alpha-globulin and its turnover in normal and hypothyroid subjects.
J. Clin. Invest. 56, 79 (1975)
12. CHENG, S.Y.
Partial amino acid sequence of human thyroxine-binding globulin. Further evidence for a single polypeptide chain.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 1212 (1977)
13. CHENG, S.Y., PAGES, R.A., SAROFF, H.A., EDELHOCH, H., ROBBINS, J.
Analysis of thyroid hormone binding to human serum prealbumin by 8-anilinonaphthalene -1-sulfonate fluorescence.
Biochemistry 16, 3707 (1977)
14. CHENG, S.Y., MORRONE, S., ROBBINS, J.
Effect of deglycosilation on the binding and immunoreactivity of human thyroxine-binding globulin.
J.Biol. Chem. 254, 8830 (1979)
15. CLARKE, M.H.G., FREEMAN, T.,
Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins.
Clin. Sci. 35, 403 (1968)
16. CLEVE, H., PATUTSCHNIK, W., NERO, S., WENDT, G.G.
Genetic studies on the Gc subtype.
Hum. Genet. 44, 117 (1978)
17. CONSTANS, J., VIAN, M., CLEVE, H., JAEGER, G., QUILICI, J.C., PALISSON, M.J.
Analysis of the Gc polymorphism in human populations by isoelectric focussing on polyacrylamid plates. Demonstrations of subtypes of the Gc allele and of additional Gc variants.
Hum. Genet. 41, 53 (1978)
18. CUATRECASAS, P., ANFINSEN, C.B.
Affinity chromatographie.
Ann. Rev. Biochem. 40, 259 (1971)
19. CUATRECASAS, P., ILLIAND, G.,
Purification of neuraminidases from Vibrio Cholerae, Clostridium perfringens and Influenza Virus by affinity chromatography.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 178 (1971)
20. CHAMNESS, G.C., MC GUIRE, W.L.,
Scatchard Plots: Common errors in correction and interpretation.
Steroids 26, 4 (1975)

21. DAVIS, B.J.
Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964)
22. DESBUQUOIS, B., AURBACH, G.D.
Use of polyethylene glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays.
J. Clin. Endocr. Metab. 33, 732 (1971)
23. DOYLE, R.J., WOODSIDE, E.E., FISCHER, C.W.
Protein-polyelectrolyte interactions. The concanavalin A precipitin reaction with polyelectrolytes and polysaccharide derivatives.
Biochem. J. 106, 35 (1968)
24. DRZENIEK, R.
Differences in splitting capacity of virus and Vibrio Cholerae neuraminidases on sialic acid type substrates.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 631 (1967)
25. FELDMANN, H., REDBARD, D.D.,
Mathematical theory of radioimmunoassay.
In: ODELL, W.D., DAUGHADAY, W.H. (eds.)
Principles of competitive protein-binding assays.
J.B. Lippincott Comp., Philadelphia, 158 (1971)
26. FERGUSON, R.N., EDELHOCH, H., SAROFF, H., ROBBINS, J.
Negative cooperativity in the binding of thyroxine to human serum prealbumin.
Biochemistry 14, 282 (1975)
27. GABRIEL, O.
Analytical disc gel electrophoresis.
Methods Enzymol. 22, 565 (1971)
28. GÄRTNER, R., HENZE, R., HORN, K., PICKARDT, C.R.,
SCRIBA, P.C.
Microheterogeneity of thyroxine-binding globulin in different metabolic states.
Acta Endocrinol. (Suppl.) (Copenh.) 225, 9 (1979)
29. GÄRTNER, R., HENZE, R., HORN, K., PICKARDT, C.R.,
SCRIBA, P.C.,
Thyroxine-binding globulin: Investigation of microheterogeneity.
J. Clin. End. Met. 52, 657 (1981)

30. GERSHENGORN, M.C., GLINDER, D., FOX, S.H., ROBBINS, J.
Thyroxine-binding globulin synthesis by
hepatocarcinoma cells in continuous culture:
Effect of physiological concentrations of
thyroxine.
Biochem.Biophys. Res. Commun. 71, 76 (1976)
31. GERSHENGORN, M.C., CHENG, S.Y., LIPPOLT, R.E.,
LORD, R.S., ROBBINS, J.
Characterization of human thyroxine-binding
globulin. Evidence for a single polypeptide chain.
J. Biol. Chem. 252, 8713 (1977)
32. GERSHENGORN, M.C., LIPPOLOT, R.E., EDELHOCH, H.,
ROBBINS, J.
Structure and stability of human thyroxine-
binding globulin.
J. Biol. Chem. 252, 8719 (1977)
33. GERSHENGORN, M.C., LIPPOLOT, R.E., EDELHOCH, H.,
ROBBINS, J.
Structure and stability of human thyroxine-
binding globulin.
J. Biol. Chem. 252, 9819 (1977)
34. GIORGIO, N.A., TABACHNICK, M.
Thyroxine-protein interactions V.
Isolation and characterization of a thyroxine-
binding globulin from human plasma.
J. Biol. Chem. 243, 2247 (1968)
35. GLINDER, D., GERSHENGORN, M.C., ROBBINS, J.
Thyroxine-binding globulin biosynthesis in
isolated monkey hepatocytes.
Biochim.Biophys. Acta 418, 232 (1976)
36. GLINDER, D., MC GUIRE, R.A., GERSHENGORN, M.C.,
ROBBINS, J., BERMAN, A.
Effects of estrogen on thyroxine-binding
globulin metabolism in rhesus monkeys.
Endocrinology 100, 9 (1977)
37. GLINDER, D., GERSHENGORN, M.C., DUBOIS, A.,
ROBBINS, J.
Correlation of thyroxine-binding globulin
synthesis by isolated rhesus monkeys hepato-
cytes after in vivo estradiol administration.
Endocrinology 100, 807 (1977)
38. GORDON, A.H., GROSS, J., O'CONNOR, D., PITT-RIVERS, R.
Nature of the circulating thyroid hormone-plasma
protein complexes.
Nature 169, 19 (1952)

39. GRABAR, P., WILLIAMS, C.A.
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophoretiques et immunochimiques d'un mélange de protéines.
Application du serum sanguin.
Biochim. Biophys. Acta 10, 193 (1953)
40. GREEN, A.M., MARSHALL, J.S., PENSKY, J., STANBURY, J.B.
Thyroxine-binding globulin: Characterization of the binding site with a fluorescent dye as a probe.
Science, 175, 1378 (1972)
41. GREEN, A.M., MARSHALL, J.S., PENSKY, J., STANBURY, J.B.
Studies on thyroxine-binding globulin.
IV. The interaction of thyroxine with thyroxine-binding globulin.
Biochim. Biophys. Acta 278, 117 (1972)
42. HAHN, H.J., HELLMANN, B., LERNMARK, Å. TÅLJEDAL, J.B.
Veränderungen der Insulinsekretion isolierter Langerhans'scher Inseln durch Behandlung mit Neuraminidase.
Acta Biol. Med. Germ. 32, 375 (1974)
43. HARPER, H.A., LÜFFLER, G., PETRIDES, P.E., WEISS, L.
Lehrbuch der physiologischen Chemie.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1975)
44. HENZE, R., GÄRTNER, R., HORN, K.
Microheterogeneity of thyroxine-binding globulin. N-acetylneuraminic acid content and binding properties.
Acta Endocrinol. (Suppl.) (Copenh.) 225, 10 (1979)
45. HORN, K., KUBICZEK, T., PICKARDT, C.R., SCRIBA, P.C.
Thyroxinbindendes Globulin: Präparation, radioimmunologische Bestimmung und klinisch-diagnostische Bedeutung.
Klin. Wochenschrift 55, 881 (1977)
46. HUDGIN, R.L., PRICER, W.E., ASHWELL, G.
The isolation and properties of a rabbit liver binding protein specific for asialoglycoproteins.
J. Biol. Chem. 249, 5536 (1974)
47. KAGEDAL, B., KÖLLBERG, M.
An improved procedure for isolation of thyroxine-binding globulin from human pregnancy serum.
Clin. Chim. Acta 78, 103 (1977)
48. KARLSSON, C., DAVIES, H., ÖHMAN, J., ANDERSSON, V.B.
LKB 2117 Multiphor. I. Analytical thin layer gel electrofocussing in polyacrylamide gel.
LKB-Produkt AB, Application note 75, Bromma Sweden (1973)

49. KAWASAKI, T., ASHWELL, G.
Chemical and physical properties of an hepatic
membrane protein that specifically binds
asialoglycoproteins.
J. Biol. Chem. 251, 1296 (1976)
50. KÖTTGEN, E.
Lectine. Struktur-Funktion und analytischer
Einsatz in biologischen Systemen.
Klin. Wochenschr. 55, 359 (1977)
51. KÖTTGEN, E., REUTTER, W., GEROK, W.
Induction and superinduction of sialylation of
membrane-bound gamma-glutamyltransferase during
liver regeneration.
Europ. J. Biochem. 82, 279 (1978)
52. KÖTTGEN, E., GEROK, W.
Pathobiochemische Aspekte der Wechselwirkung
zwischen Glykoproteinen und Glykoprotein-
rezeptoren.
Med. Welt 30, 20 (1979)
53. KÖTTGEN, E., BAUER, C., REUTTER, W., GEROK, W.
Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen
Bedeutung von Glykoproteinen. I. Grundlagen
und interdisziplinäre Gesichtspunkte.
Klin. Wochenschr. 57, 151 (1979)
54. KÖTTGEN, E., BAUER, C., REUTTER, W., GEROK, W.
Neue Ergebnisse zur biologischen und medizinischen
Bedeutung von Glykoproteinen. II. Ausgewählte
klinische Fachgebiete.
Klin. Wochenschr. 57, 199 (1979)
55. KORCEK, L., TABACHNICK, M.
Further characterization of human thyroxine-
binding globulin.
Biochim. Biophys. Acta 371, 323 (1974)
56. KORCEK, L., TABACHNICK, M.
Thyroxine-protein Interactions. Interaction of
thyroxine and triiodothyronine with human TBG.
J. Biol. Chem. 251, 3558 (1976)
57. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., LEWIS FARR, A., RANDALL, R.J.
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
58. MARSCHNER, J., EHRHARDT, F., SCRIBA, P.C.
Calculation of the radioimmunoassay standard
curve by "spline function".
In: Radioimmunoassay and related procedures in
medicine (I)
Eds: GARCIA, E.J., BELCHER, E.H.,
IAEA Wien (1974)

59. MARSHALL, J.S., PENSKY, J.
Purification of TBG and immunologic studies on the relationship between TBG from normal persons and those with TBG "deficiency".
J. Clin. Invest. 48, 508 (1969)
60. MARSHALL, J.S., PENSKY, J.
Some physical characteristics of TBG and its interactions with thyroxine.
Arch. Biochem. Biophys. 146, 76 (1971)
61. MARSHALL, J.S., PENSKY, J., GREEN, A.M.
The nature of slow thyroxine-binding globulin.
J. Clin. Invest. 51, 3173 (1972)
62. MARSHALL, J.S., PENSKY, J., WILLIAMS, S.
Isoelectric focusing evidence for microheterogeneity of thyroxine-binding globulin.
Arch. Biochem. Biophys. 156, 456 (1973)
63. MARSHALL, J.S., GREEN, A.M., PENSKY, J., WILLIAMS, S., ZINN, A., CARLSON, D.M.
Measurement of circulation desialylated glycoproteins and correlation with hepatocellular damage.
J. Clin. Invest. 54, 555 (1974)
64. MAURER, H.R.
Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.
De Gruyter Verlag Berlin-New York (1971)
65. MAYRON, L.W., ROBERT, B., WINZLER, R.J., RAFELSON, M.E.
Studies on the neuraminidase of Influenza virus.
Arch. Biochem. Biophys. 92, 475 (1961)
66. MORELL, A.G., IRVINE, R.A., STERNLIEB, J., SCHEINBERG, J.H., ASHWELL, G.
Physical and chemical studies on ceruloplasmin.
J. Biol. Chem. 243, 155 (1968)
67. MORELL, A.G., GREGORIADIS, G., SCHEINBERG, J.H., HICKMAN, J., ASHWELL, G.
The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation.
J. Biol. Chem. 246, 1461 (1971)
68. MORI, K.F.
Antigenic structure of human gonadotropin's contribution of carbohydrate moiety to the antigenic structure of pituitary follicle-stimulating hormone.
Endocrinology 85, 330 (1969)

69. NELSESTUEN, G.L., SUTTIE, J.W.
Properties of asialo and aglycoprothrombin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 198 (1971)
70. NILSSON, S.F., PETERSON, P.A.
Evidence for multiple thyroxine-binding sites
in human prealbumin.
J. Biol. Chem. 246, 6098 (1971)
71. NILSSON, S.F., PETERSON, P.A.
The subunit of human thyroxine-binding globulin
and its interaction with ligands.
J. Biol. Chem. 250, 8543 (1975)
72. OLSON, M.O.J., LIENER, J.E.
Some physical and chemical properties of the
concanavalin a, the phytohemagglutinin of the
jack bean.
Biochemistry 6, 105 (1967)
73. OPPENHEIMER, J.H.
Role of the plasma proteins in the binding,
distribution of the thyroid hormones.
N. Engl. J. Med. 278, 1153 (1968)
74. PAGES, R.A., ROBBINS, J., EDELHOCH, H.
Binding of thyroxine and thyroxine analogs
to human serum prealbumin.
Biochemistry 12, 2773 (1973)
75. PENHALIGON, J., WELLBY, M.L.
Elevated serum thyroxine-binding globulin by
X-chromosome transmission.
Acta Endocrinol. 99, 393 (1982)
76. PENSKY, J., MARSHALL, J.S.
Separation of thyroxine-binding globulin from
human serum by affinity chromatographie.
Arch. Biochem. Biophys. 135, 304 (1969)
77. PHARMACIA
Gel filtration. Theory and practice.
Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden
78. PICKARDT, C.R., BAUER, M., HORN, K., KUBICZEK, T.
SCRIBA, P.C.
Vorteile der direkten Bestimmung des Thyroxin-
bindenden Globulins in der Schilddrüsendiagnostik.
Internist 18, 538 (1977)

79. PREMACHANDRA, B.N., PERLSTEIN, J.B. Blumenthal, H.T.
Studies on obesity. II. Slow-moving thyroxine-binding globulin in the sera of normal and obese subjects.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 30, 752 (1970)
80. PRINCE, H.P., RAMSDEN, D.B.,
A new theoretical description of the binding of thyroid hormones by serum proteins.
Clin. Endocrinol. 7, 307 (1977)
81. RAFELSON, M.E., GOLD, S., PRIEDE, J.
Neuraminidase from Influenza virus.
Methods Enzymol. 8, 677 (1966)
82. RAZ, A., GOODMAN, D.S.
The interaction of thyroxine with human plasma prealbumin and with the prealbumin-retinol-binding protein complex.
J. Biol. Chem. 244, 3230 (1969)
83. REFETOFF, S., FANG, V.S., MARSHALL, J.S.
Some physical, chemical and biological properties of radioiodinated TBG and partially desialylated TBG.
J. Clin. Invest. 56, 177 (1975)
84. Robbins, J., RALL, J.E.
The interactions of thyroid hormones and protein in biological fluids.
Recent Prog. Horm. Res. 13, 161 (1957)
85. ROBBINS, J., RALL, J.E.
Proteins associated with the thyroid hormones.
Physiol. Rev. 40, 415 (1960)
86. ROBBINS, J., CHENG, S.Y., GERSHENGORN, M.C., GLINDER, D. COHNMANN, H.J., EDELHOCH, H.
Thyroxine transport proteins of plasma. Molecular properties and biosynthesis.
Recent Prog. Horm. Res. 34, 477 (1978)
87. ROSENTHAL, H.E.
A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system.
Analyt. Biochem. 20, 525 (1967)
88. Scatchard, G.
The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann.N.Y.Acad. Sci. 51, 660 (1949)

89. SCATCHARD, G., HUGHES, W.L., GURD, F.R.N., WILCOX, P.E.
Chemical specificity in biological interactions.
In: GURD, F.R.N. (edt.)
Memoirs of the University laboratory related to
Medicine and Public Health.
Academic Press N.Y. 193 (1954)
90. SCHACHMANN, H.K.
Techniques for characterization of proteins.
II. Ultracentrifugation, diffusion, viscometry.
Methods Enzymol. 4, 32 (1957)
91. SCHULTZ, H.E.
Influence of bound sialic acid on electrophoretic
mobility of human serum proteins.
Arch. Biochem. Biophys. 1 (Suppl.), 290 (1962)
92. SCHWARTZ, U., HAMMERSTEIN, J.
A combined adsorption-gel filtration technique for
the determination of the cortisol-binding capacity
of transcortin.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 13, 291 (1975)
93. SEAL, U.S., DOE, R.P.
Purification, some properties and composition of
the corticosteroid and thyroxine-binding globulins
from human serum.
Experita. Med. Int. Congr. Ser. No. 83, 325 (1964)
94. SERAFINI-CESSI, F.
Serum glycoproteins after partial hepatectomy
in the rat.
Biochem. J. 158, 153 (1976)
95. SERAFINI-CESSI, F.
Sialyltransferase activity in regenerating rat liver.
Biochem. J. 166, 381 (1977)
96. SODETZ, J.M., PIZZO, S.V., MC KNEE, P.A.
Relationship of sialic acid to function and in
vivo survival of human factor VIII/v. Willebrand
factor protein.
J. Biol. Chem. 252, 5538 (1977)
97. STERLING, K., TABACHNICK, M.
Paper electrophoretic demonstration of thyroxine-
binding prealbumin fraction in serum.
Endocrinology 68, 1073 (1961)
98. STERLING, K., HAMADA, S., TAKEMURA, Y., BRENNER, M.A.,
NEWMAN, E.S., INADA, M.
Preparation and properties of thyroxine-binding
alpha-globulin (TBG).
J. Clin. Invest. 50, 1758 (1971)

99. STOCKERT, R.J., MORELL, A.G., SCHEINBERG, J.H.
The existence of a second route for the transfer
of certain glycoproteins from the circulation in
the liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 988 (1976)
100. SYNDER, S.M. CAVALIERI, R.R., GOLDFINE, J.D., INGBAR, S.H.
JØRGENSEN, E.D.
Binding of thyroid hormones and their analogues
to thyroxine-binding globulin in human serum.
J. Biol. Chem. 251, 6489 (1976)
101. TABACHNICK, M., KORCEK, L.
Binding constants for interaction of thyroxine
analogues with the thyroxine binding site of
human thyroxine-binding globulin
Biochim. Biophys. Acta 557, 169 (1978)
102. THOMAS, P., HEMS, D.A.
Hepatic clearance of circulating native and
asialo-carcinoembryonic antigen by the rat.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1205 (1975)
103. VAN BAELEN, H., MANNAERTS, G.
The role of sialic acid in determining the survival of
transcortin in the circulation.
Arch. Biochem. Biophys. 163, 53 (1974)
104. VAN DER HAMER C.J.A., MORELL, A.G.; SCHEINBERG, J.H.,
HICKMAN, J., ASHWELL, G.
Physical and chemical studies on ceruloplasmin.
IX. The role of galactosylresidues in the
clearance of ceruplasmin from the circulation.
J. Biol. Chem. 245, 4397 (1970)
105. VAN LENTEN, L., ASHWELL, G.
The binding of desialylated glycoproteins to
plasma membranes of rat liver.
J. Biol. Chem. 247, 4633 (1972)
106. VRETBAD, P.
Purification of lectins by biospecific affinity
chromatography.
Biochim. Biophys. Acta 434, 169 (1976)
107. WARREN, L.
The thiobarbituric acid assay of sialic acids.
J. Biol. Chem. 234, 1971 (1959)
108. WEDER, H.G., BICKEL, M.H.
Verbessertes Gerät zur Gleichgewichtsdialyse.
Z. Anal. Chem. 252, 253 (1970)

109. WEDER, H.G., SCHILDKNECHT, J. KESSELRING, P.
A new equilibrium dialyzing system.
Amer. Lab. No. 10, 15 (1971)
110. WEDER, H.G., SCHILDKNECHT, J., LUTZ, R.A.,
KESSELRING, P.
Determination of binding parameters from
Scatchard plots: Theoretical and practical
considerations.
Eur. J. Biochem. 42, 475 (1973)
111. WEIGEL, P.H., SCHNELL, E., LEE, Y.C., ROSEMAN, S.
Specific adhaesion of rat hepatocytes to
-galactosides linked to polyacrylamide gels.
J. Biol. Chem. 253, 330 (1978)
112. WINTER, A., PERLMUTTER, H. DAVIES, H.
Preparative flat-bed electrofocussing in a
granulated gel with the LKB 2117 Multiphor.
LKB Producter AB Application note 198
Bromma Sweden (1975)
113. WINTER, A. EK, K., ANDERSSON, U.B.
Analytical electrofocussing in thin layers of
polyacrylamide gels.
LKB Producter AB Application note 250
Bromma Sweden (1977)
114. WOEBER, K.A., INGBAR, S.H.
The contribution of thyroxine-binding prealbumin
to the binding of thyroxine in human serum, as
assessed by immunoabsorbtion.
J. Clin. Invest. 47, 1710 (1968)
115. YPHANTIS, D.A.
Equilibrium ultracentrifugation of dilute solutions.
Biochemistry 3, 297 (1964)
116. ZAHLER, W.L.
Analytical polyacrylamid gel electrophoresis and
molecular weight determination.
Methods Enzymol. 32, 70 (1974)
117. ZINN, A.B., MARSHALL, J.S., CARLSON, D.M.
Preparation of glycopeptides and oligosaccharides
from thyroxine-binding globulin.
J. Biol. Chem. 253, 6761 (1978)
118. ZINN, A.B., MARSHALL, J.S., CARLSON, D.M.
Carbohydrate structures of thyroxine-binding globulin
and their effects on hepatocyte membrane binding.
J. Biol. Chem. 253, 6768 (1978)

7. Verzeichnis der Abkürzungen

A	Akzeptor
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
B	Bound (gebundener Anteil des Liganden)
cpm	counts per minute = Zählraten
DTBG	vollständig desialisiertes TBG
F	Free (freier Anteil des Liganden)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
K_A	Assoziationskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
L	Ligand
Lsg	Lösung
M	Meßwert, mol/l
MG	Molekulargewicht
n	Anzahl
NANA	N-Acetylneuraminsäure
PAG	Polyacrylamidgel
PEG	Polyäthylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
RIA	Radioimmunoassay
SDS	Natriumdodecylsulfat
STBG	"slow TBG" = teilweise desialisiertes TBG
T_3	Trijodthyronin
T_4	Thyroxin
TBG	thyroxinbindendes Globulin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyläthylendiamin
Ufkt	Umrechnungsfaktor
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	volume per volume = Volumenprozent
w/v	weight per volume = Gewichtsprozent
[]	Zeichen für Konzentration
[]	Zeichen für Gleichung

LEBENS LAUF.

Ich bin am 18. Mai 1955 in Oberstdorf als Sohn des Malermeisters Heinrich Henze und seiner Ehefrau Walburga geb. Wolf als zweites Kind geboren.

Nach Besuch der Volksschule von 1961 - 65 war ich bis zum Abitur im Jahre 1974 im Gertrud-von-le-Fort-Gymnasium in Oberstdorf.

Nach zehnmonatigem Dienst bei der Bundeswehr begann ich im Sommersemester 1975 mit dem Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität in München.

1977 legte ich die Ärztliche Vorprüfung, 1978 den ersten, 1980 den zweiten und im Mai 1981 den dritten Teil der Ärztlichen Prüfung ab.

Nach dem Volontariat in der Hauner'schen Kinderklinik der Universität begann ich im Januar 1982 mit der Weiterbildung zum Arzt für Anästhesie und Intensivmedizin im Kreiskrankenhause Ebersberg. Seit März 1985 bin ich als Assistenzarzt in der anästhesiologischen Abteilung des städtischen Krankenhauses München-Bogenhausen.

Die vorliegende Arbeit begann ich im Juni 1978 in den Labors für experimentelle Endokrinologie der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München.

